

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**DIE ANTIKÖRPERBILDUNG
DER MIT HERPES SIMPLEX VIRUS TYP 1
PRIMÄR INFIZIERTEN MAUS**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von
ANDREAS KNOBLICH
aus Trier

Mainz, 1984

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

DIE ANTIKÖRPERBILDUNG
DER MIT HERPES SIMPLEX VIRUS TYP 1
PRIMÄR INFIZIERTEN MAUS

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Andreas K n o b l i c h

aus Trier

Mainz, 1984

Dekan: Professor Dr.med.,Dr.med.dent.W.Ketterl

1. Gutachter: Professor Dr.med. D. Falke

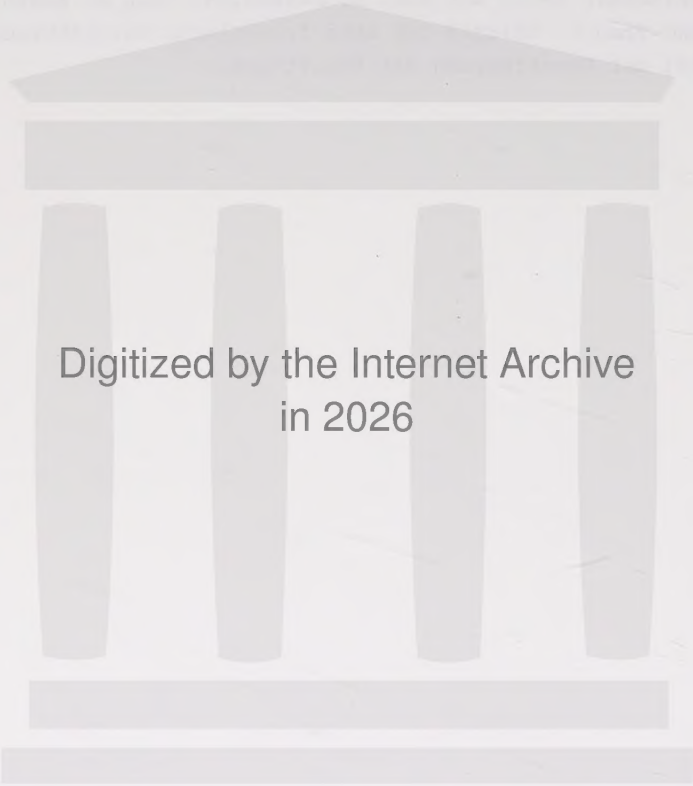
2. Gutachter: Professor Dr.med. U. Hadding

Tag der Promotion: 17. 10. 1984

Gewidmet allen, die mich so weit gefördert haben, daß
ich mit der Anfertigung dieser Arbeit beginnen konnte.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. D. FALKE für die Überlassung des Themas, für seine kritische Beratung bei der Versuchsplanung und für seine wirkungsvolle Förderung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau D. FRIEDRICH, Frau M. ENGEL und Frau B. KNIERIM für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Seite

A.	Einleitung	1
1.	Die Herpesviren	1
1.1	Die Charakterisierung der Herpes simplex Virionen	1
1.2	Die klinische Bedeutung von Herpes simplex Infektionen	2
1.3	Die Pathogenese der experimentellen Herpes- infektion der Maus	5
1.3.1	Die akute Infektion	5
1.3.1.1	Die intraperitoneale Infektion	6
1.3.1.2	Die Infektion in die Fußsohle	6
1.3.1.3	Die intracerebrale Infektion	7
1.3.1.4	Die subcutane und die intracutane Infektion	7
1.3.1.5	Die labiale Infektion	8
1.3.1.6	Die nasale Infektion	8
1.3.1.7	Die corneale Infektion	8
1.3.1.8	Die Infektion der Ohrwurzel	9
1.3.1.9	Die intravaginale Infektion	9
1.3.2	Der Einfluß des HSV-Serotyps auf die Patho- genese	9
1.3.3	Die persistente Infektion durch HSV	10
2.	Die Reaktionen des Immunsystems bei der HSV-Infektion	11
2.1	Immunmechanismen allgemein	11
2.1.1	Die Gliederung des Immunsystems	12
2.1.2	Die Induktion einer Antikörper-Antwort	12
2.1.3	Die Virusneutralisation	15
2.2	Immunologische Befunde bei Herpesinfektionen	17
2.2.1	Die angeborene Resistenz	17
2.2.2	Zelluläre Immunmechanismen	18
2.2.2.1	Makrophagen	19
2.2.2.2	T-Lymphozyten	20
2.2.3	Humorale Immunmechanismen	21
2.2.3.1	Antikörper	21
2.2.3.2	Die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxi- zität (ADCC)	25
2.2.4	Immunologische Aspekte der Persistenz und der Reaktivierung	26
3.	Problemstellung der Arbeit	27
B.	Material und Methoden	28
1.	Zellkultur	28
1.1	Kulturmedien	28
1.2	Zellen	29
1.2.1	Kaninchennieren-Zellen	29
1.2.2	Mäuseembryo-Fibroblasten	29
1.2.3	Vero-Zellen	30
1.2.4	BHK-Zellen	30
1.2.5	Gebrauchsansätze für Zellen	30

	Seite
2.	Viren 30
2.1	Viruszüchtung 31
2.2	Titration von Virus-Pools 31
3.	Durchführung der Mäuseversuche 32
3.1	Mäuse 32
3.2	Injektionen/Infektion 32
3.3	Gewinnung von Blutproben 32
3.4	Behandlung der Blutproben 32
3.5	Peritonealexsudatzellen: Gewinnung, Kultur- überstände, Titration und HSV-Antigennachweis durch den Antikörperproduktionstest 33
3.6	Organpräparation und -titration 34
3.7	Kastration/Ovariectomie 35
4.	Bestimmung der Antikörper-Spiegel 36
4.1	Neutralisierende Antikörper gegen HSV 36
4.1.1	Durchführung des Neutralisationstests 36
4.1.2	Berechnung des Antikörper-Titers 37
4.2	Hämolysierende Antikörper gegen Schafs- erythrozyten (SRBC) 39
4.2.1	Hämolysin-Test 39
4.2.1.1	Veronal-Puffer (VP) 39
4.2.1.2	Schafserythrozyten (SRBC) 39
4.2.1.3	Komplement 40
4.2.1.4	Praktische Durchführung 40
4.2.2	Berechnung des Hämolysin-Titers 41
4.3	Statistische Auswertung 41
5.	Der Nachweis von Interferon 41
6.	Wirkstoffe 43
C.	Ergebnisse 45
1.	Allgemeine Aspekte der Bildung neutralisie- render Antikörper in mit HSV-1 primär infi- zierten Mäusen 45
1.1	Der zeitliche Verlauf der Antikörper-Spiegel nach einer primären i.p.-Infektion mit HSV-1 45
1.2	Der Einfluß der Virusdosis auf die Höhe der Antikörper-Spiegel 47
1.3	Der Einfluß des Inokulationsortes auf das Ausmaß der Antikörper-Antwort 49
1.4	Der Vergleich verschiedener HSV-1-Stämme hinsichtlich der Humoralimmunität bei einer primären Infektion der Maus 49
1.5	Die Antikörper-Spiegel in inaktivierten Seren 51
2.	Der Einfluß verschiedener physiologischer Faktoren auf die HSV-Antikörper 53
2.1	Der Einfluß des H-2-Haplotyps und des Back- ground-Genoms auf die Antikörper-Spiegel 53
2.2	Die Antikörper-Spiegel bei F ₁ -Mäusen aus (C57BL/6 x NMRI) 55

2.3	Der Einfluß einer Ovariectomie bzw. einer Kastration auf die Höhe der HSV-Antikörper-Spiegel	56
2.4	Die Wirkung von antiandrogenen Substanzen auf die Antikörper-Bildung	57
3.	Die Bedeutung der Makrophagen für die HSV-Antikörper-Antwort	60
3.1	Die Antikörper-Spiegel bei Silikat-behandelten Mäusen	60
3.2	Der Einfluß von Silikat auf die HSV-Vermehrung in verschiedenen Geweben	63
3.3	Der Nachweis von infektiösem HSV und von HSV-Antigen in den Peritonealmakrophagen nach einer Primärinfektion	65
3.4	Die Wirkung von Silikat auf die Antikörper-Spiegel nach der Immunisierung mit einer Formalin-inaktivierten HSV-Vakzine	66
3.5	Die Antikörper-Spiegel nach einer Transfusion von syngenischen Peritonealexsudatzellen	67
3.6	Der Einfluß der Kulturüberstände von Makrophagen auf die Antikörper-Bildung	67
3.7	Die Wirkung von Indometacin auf die Antikörper-Bildung	69
3.8	Der Einfluß von Dextransulfat 500 000 auf die Antikörper-Bildung	70
3.9	Die Wirkung von Freundschem Adjuvans (FA) bei der experimentellen HSV-Infektion	71
4.	Der Einfluß von Interferoninduktoren und von Natural-Killer-Zellen auf die HSV-Antikörper-Titer	73
4.1	Die Beeinflussung der Antikörper-Titer durch Poly-I:C(LC)	73
4.2	Das Verhalten der HSV-Antikörper-Spiegel bei Beige-Mäusen	75
5.	Der Einfluß des T-Zell-Mitogens Bestatin auf die HSV-Antikörper-Bildung	76
5.1	Die Abhängigkeit der Wirksamkeit von Bestatin vom Zeitpunkt der Verabfolgung	76
5.2	Der Einfluß der Dosis auf die Wirksamkeit von Bestatin	79
5.3	Der zeitliche Verlauf der Antikörper-Spiegel nach der Gabe von Bestatin	79
5.4	Der Einfluß von Bestatin auf den Infektionsverlauf	82
5.5	Die Wirkung von Epibestatin	82
5.6	Die Wirkung von Bestatin bei einer sekundären HSV-Infektion	86
5.7	Der Einfluß von Silikat auf die Bestatin-vermittelte Steigerung der HSV-Antikörper-Titer	86
5.8	Die Untersuchung von Makrophagenüberständen auf ihre Fähigkeit, die Unempfindlichkeit gegenüber Bestatin aufzuheben	92

		Seite
5. 9	Der Einfluß von Indometacin und von Poly-I:C(LC) auf die Empfindlichkeit des Antikörper-bildenden Apparates für Bestatin	92
5.10	Die Prüfung einer Interferon-Induktion durch Bestatin	94
5.11	Die Wirkung von Bestatin auf die Antikörper-Bildung gegen Schafserythrozyten (SRBC)	96
5.12	Die Beeinflussung der Antikörper-Spiegel durch Cyclosporin A	97
6.	Die Wirkung von Cyclophosphamid auf die HSV-Antikörper-Spiegel	99
D.	Diskussion	101
1.	Allgemeine Aspekte der Bildung neutralisierender Antikörper in mit HSV-1 primär infizierten Mäusen	101
2.	Der Einfluß verschiedener physiologischer Faktoren auf die HSV-Antikörper	104
3.	Die Bedeutung der Makrophagen für die HSV-Antikörper-Antwort	107
4.	Der Einfluß von Interferoninduktoren und von Natural-Killer-Zellen auf die HSV-Antikörper-Titer	110
5.	Der Einfluß von Bestatin auf die Antikörper-Bildung	113
6.	Die Wirkung von Cyclophosphamid auf die HSV-Antikörper-Spiegel	119
7.	Synoptische Betrachtung der Ergebnisse	120
E.	Zusammenfassung	123
F.	Abkürzungen	126
G.	Literaturverzeichnis	128

A. Einleitung

1. Die Herpesviren

Die Mitglieder der Familie der Herpesviridae können warm- wie kaltblütige Vertebraten, aber auch Invertebraten als Wirt befallen. Für die Übertragung ist vielfach der Kontakt zwischen Schleimhäuten bedeutsam, jedoch können Herpesviren auch plazentar, in den Geburtswegen, über die Brustmilch oder durch Bluttransfusionen übertragen werden. Nach erfolgter Infektion können die Viren in einem okkulten Zustand lebenslang im Wirtsorganismus überdauern: Der Organismus bleibt infiziert, ohne daß das Virus in infektiöser Form nachweisbar wäre. Dieser okkulte Zustand wird trotz der Anwesenheit humoraler Antikörper und spezifisch stimulierbarer Lymphozyten beobachtet.

Zu den humanpathogenen Herpesviridae rechnet man Herpes simplex Virus (HSV) Typ 1 und Typ 2, das Varizellen-Zoster-Virus, das Cytomegalievirus und das Epstein-Barr-Virus (84,198).

1.1 Die Charakterisierung der Herpes simplex Virionen

Die Herpes simplex Virionen haben einen Durchmesser von 120 bis 200 nm, der Durchmesser der icosaedrischen Capside (162 Capsomere) liegt zwischen 100 und 110 nm. Eine doppelschichtige Hülle umgibt das Capsid. Das Molekulargewicht der linearen, doppelsträngigen DNA beträgt 96×10^6 D. Etwa die Hälfte der Sequenz ist für die beiden vorhandenen Serotypen 1 und 2 identisch (234).

Durch elektrophoretische Auftrennung von HSV-Material im zweidimensionalen Gel können etwa 250 viruscodierte Proteine unterschieden werden. Über 50 dieser Peptid-Spots sind bisher identifiziert worden, darunter auch die 4 Hauptglykoproteine, gB, gC, gD und gE (167,198,202,229), das Hauptcapsidprotein

und das Haupt-DNA-bindende Protein. Die Glykoproteine stellen den überwiegenden Anteil der Proteine der Virusoberfläche dar (229) und sind daher von Bedeutung für die Interaktionen des HSV mit Zellmembranen. Das Glykoprotein gB (MW 126.000) (43) scheint für die Penetration des Virus in die Wirtszelle erforderlich zu sein; weiterhin ist es von Bedeutung für die HSV-induzierte Zellfusion. Glykoprotein gC (MW 129.000) kann auf HSV-infizierten Zellen als Rezeptor für ein Spaltprodukt der dritten Komplementkomponente, C3b, fungieren (55). Darüber hinaus soll es die Ausprägung der Zellfusion modulieren. Eine Fc-Rezeptor-Funktion ist für das Glykoprotein gE (MW 65-80.000) beschrieben worden. Über die Funktion des Glykoproteins gD (MW 52-57.000) ist nur wenig bekannt (40,167,229). Es stellt offenbar die wichtigste Zielstruktur für neutralisierende Antikörper dar (30). Die Glykoproteine gB und gD besitzen vorwiegend Serotyp-gemeinsame Epitope, während gC überwiegend typenspezifische Determinanten trägt (44).

Nach einer Infektion mit dem HSV können 2-4 Stunden später "frühe" viruscodierte Proteine in der Wirtszelle nachgewiesen werden. Unterschiedliche Angaben werden über den Zeitpunkt des Auftretens virusinduzierter Proteine in der Zellmembran gemacht. Der Nachweis gelang je nach Methode und verwendeten Zellen zwischen 6 und 24 Stunden nach der Infektion (17,197). Infektiöses Tochtervirus findet man ab der 6. Stunde p.i. Ein replikativer Zyklus endet nach etwa 17 bis 19 Stunden mit der Freisetzung von Tochterviren und der Zerstörung der Zelle.

1.2 Die klinische Bedeutung von Herpes simplex Infektionen

Die Mehrzahl der Primärinfektionen mit dem Herpes simplex Virus Typ 1 geht von Personen aus, die als asymptomatische Träger das Virus im Speichel ausscheiden (191). Etwa 90 % der Primärinfektionen verlaufen inapparent. Mittels serologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in den westlichen Industrieländern über 90 % der erwachsenen Bevölkerung mit

dem HSV infiziert wurden (176). Klinisch manifeste Erkrankungen werden jedoch nur bei 5 bis 10 Prozent beobachtet. Primärinfektionen verlaufen bei Erwachsenen schwerer als bei Kindern. Der größte Teil der Infektionen im Gesichtsbereich wird durch HSV-1 hervorgerufen, während HSV-2 vor allem Infektionen im Genitalbereich verursacht (212,213). Die Besonderheit der Infektionen mit den HSV ist darin zu sehen, daß nach der primären Infektion die Viren nicht vollständig aus dem Körper eliminiert werden. Im Verlauf der Infektion gelangt das Virus durch zentripetale Wanderung entlang peripherer Nerven in deren erstes Ganglion. Nervenzellen des Ganglions werden persistent infiziert: Das Virus kann dann nicht mehr in infektiöser Form nachgewiesen werden. Sehr verschiedenartige Reize (UV-Bestrahlung, Fieber, Menstruation, mechanische Irritation des peripheren Nerven, Schreck) können jedoch eine Reaktivierung des Virus herbeiführen, so daß klinische Erscheinungen als Rezidive der Primärerkrankung beobachtet werden (102,213).

Die häufigste Herpeserkrankung ist der Herpes labialis recidivans. Im oralen Bereich findet sich außerdem die meist primäre Gingivostomatitis aphthosa herpetica. Herpeseruptionen auf der Haut können nahezu überall am Körper auftreten. Bei Kindern mit endogenem Ekzem sind Verläufe als Ekzema herpeticum (Kaposi) häufig. An den Augen können Herpesinfektionen eine Konjunktivitis hervorrufen, jedoch auch eine Keratitis, die durch Narbenbildung zur Erblindung führen kann, eine Iridocyclitis, eine Chorioretinitis und eine Panuveitis (156). Weitere wichtige Erkrankungen sind die Herpesmeningitis (besonders durch HSV-2) und die -Enzephalitis (besonders durch HSV-1) (1). Auch Myelitiden und Radikulitiden wurden beschrieben. Patienten mit angeborenen und mit erworbenen (auch iatrogenen) Immunmangelzuständen können an schwer verlaufenden viszeralen HSV-Infektionen erkranken (13). Neben den HSV-Enzephalitiden sind bei immunologisch noch unreifen Neugeborenen nach einer Infektion sub partu HSV-Sepsis-Erkrankungen beschrieben worden, für deren Verlauf und Prognose vor allem die Schwere der dabei auftretenden Hepatitis ein wichtiger Indikator ist. Auch nekrotisierende Vaskulitiden sind dabei

beobachtet worden (184). Herpesinfektionen des schwangeren Uterus nehmen ihren Ausgang von der Cervix. Neben einer erhöhten Abortrate können sie zu kongenitalen Mißbildungen (Mikrozephalie, intrakranielle Verkalkungen, diffuser Hirnschaden, geistige Retardierung, Augenmißbildungen) führen (1).

Neurologischerseits wird zwischen HSV-Infektionen und der Bellischen Parese (47), der Stimm lippenlähmung (via N. recurrens), dem M. Parkinson und der Alzheimerschen Erkrankung eine Korrelation angenommen. Für verschiedene Erkrankungen der viszeralen Organe werden Infektionen mit dem HSV mitverantwortlich gemacht, bzw. wird HSV als auslösendes Agens beschrieben, so für Oesophagitiden (228), Ulcera duodeni (99), Proctitiden (bei Homosexuellen) (178) und Pneumonien (189).

Das gehäufte Auftreten von Antikörpern gegen HSV-2 bei Patientinnen mit Cervix-Karzinomen legt die Annahme nahe, daß Viren dieses Serotyps für die Entstehung derartiger Tumoren zumindest mitverantwortlich sind (57,157). In verschiedenen Fällen konnte gezeigt werden, daß bestimmte Fragmente der HSV-2-DNA mit DNA-Extrakten aus Cervix-Tumoren hybridisierten (B. Clements, persönliche Mitteilung).

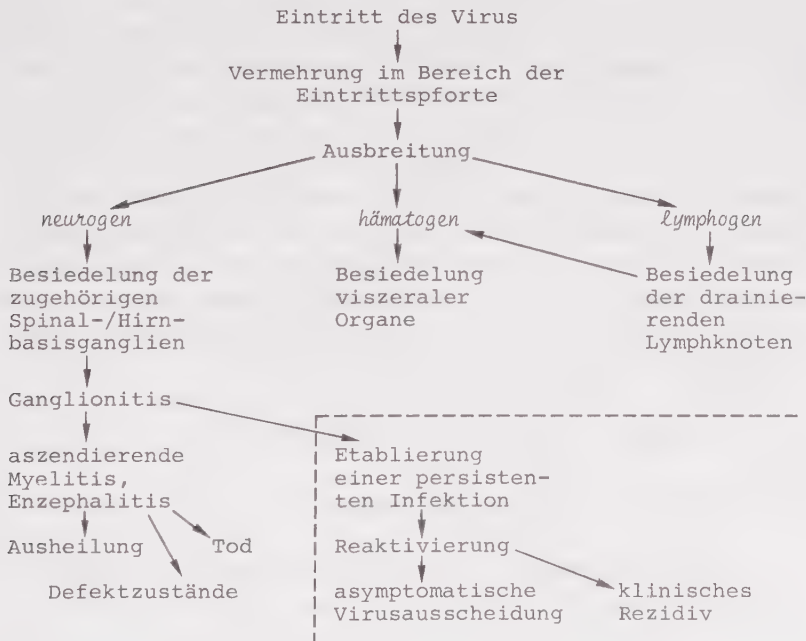
Zur Behandlung herpetischer Infektionen stehen heute eine Reihe von Substanzen zur Verfügung, welche die Aktivität der HSV-kodierten DNA-Polymerase und damit die Virusvermehrung hemmen. Am effektivsten scheint derzeit das Acycloguanosin (ACG) zu sein. Resistenzentwicklungen unter der ACG-Therapie wurden jedoch oftmals beobachtet. Weiterhin finden Adenosin-arabinosid (Ara-A), Joddesoxyuridin (IdU), Phosphonoformat und -acetat Verwendung. Eine vielversprechende Neuentwicklung scheint das 2'-Nordesoxyguanosin (2'-NDG) zu sein. Der prophylaktische und therapeutische Erfolg von Herpes Vakzinen ist bisher nicht überzeugend dargelegt worden.

1.3 Die Pathogenese der experimentellen Herpesinfektion der Maus

Herpesviren vermehren sich in verschiedenen Arten von Mäusezellen *in vivo* und *in vitro*. Infolgedessen ist das "System Maus" gut geeignet, um die Ausbreitung der HSV-Infektion *in vivo* und die Permissivität von Mäusezellen *in vitro* unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen.

1.3.1 Die akute Infektion

Prinzipiell laufen HSV-Infektionen nach einem bestimmten Schema ab:



Bei tödlichen Verläufen sieht man entweder aufsteigende spinale Lähmungen und Tod an einer Enzephalitis oder ein perakutes Versterben der Tiere ohne besondere Vorzeichen. Tiere, welche die Infektion überleben, zeigen neurologische Symptome meistens nur vorübergehend oder überhaupt nicht. Selten bleiben sichtbare Lähmungen zurück. Die Schwere des Krankheitsbildes, die von der Geschwindigkeit und der Topographie der Virusausbreitung mitbestimmt wird, ist abhängig von der Pathogenität (speziell: Neuropathogenität) des Virus und von der applizierten Dosis. Die im folgenden geschilderten Infektionsverläufe stellen die jeweiligen Maximalvarianten dar.

1.3.1.1 Die intraperitoneale Infektion (25,54,133,193,194)

Nach intraperitonealer Infektion erfolgt sehr schnell eine Besiedlung viszeraler Organe, der Milz, der Leber und des Thymus. Bei Infektionen mit dem HSV-2 tritt in der Leber eine fokal nekrotisierende Hepatitis auf (133,134,135,139). In der Niere läßt sich Virus nicht regelmäßig nachweisen. Das Rückenmark wird erst dann vom Virus besiedelt, wenn jenes aus den viszeralen Organen bereits eliminiert worden ist. Im Rahmen der hämatogenen Ausbreitung des Virus kann es an Thrombozyten gebunden nachgewiesen werden; HSV-Ag wird auch in Megakaryozyten gefunden. Nach i.p. Infektionen mit hoher Multiplizität (10^6 Pfu) ist HSV auch aus den Nebennieren isoliert worden (U. Knichel, pers. Mitteilung).

1.3.1.2 Die Infektion in die Fußsohle (25,111)

Bei neugeborenen Mäusen wird nach intraplantarer Infektion das Virus zuerst in den Epidermiszellen und im Bindegewebe, später in Assoziation zu kleinen Nervenästen nachgewiesen. Dann findet man eine aktive Virusvermehrung in den Schwann-

schen Zellen des Ischiasnervs. Im Nerven selbst lassen sich abnorm gestaltete Nervenfasern nachweisen. Als nächstes werden die Spinalganglien und die Pia mater spinalis in die Infektion miteinbezogen. Vom Spinalganglion breitet sich das Virus zunächst im homo-, dann im kontralateralen Rückenmark aus; es kann in Neuronen und in Oligodendroglia nachgewiesen werden; die Zahl der Mikroglia ist erhöht. Im Rahmen einer ascendierenden Myelitis gelangt das Virus in die Medulla oblongata, die Pons und in das Großhirn. Mitunter erfolgt eine hämatogene Ausbreitung in die inneren Organe. Beim erwachsenen Tier können bei Befall des Rückenmarks schlaffe Lähmungen der Hinterbeine auftreten. Die Letalität ist geringer als nach einer i.p.-Infektion. Es ist nicht geklärt, ob bei erwachsenen Mäusen die Ausbreitung des Virus in allen Details gleichartig erfolgt. Speziell bezüglich der Wanderung des Virus im Nerven bestehen hier Unklarheiten.

1.3.1.3 Die intracerebrale Infektion (194)

Die lokale Vermehrung des Virus bewirkt eine Enzephalitis. Erkrankte Tiere sind irritierbar und zeigen Muskelzuckungen. In Abhängigkeit von der Neuropathogenität sterben sie innerhalb weniger Tage nach der Infektion. Zu einer Ausbreitung des Virus in die inneren Organe kommt es nicht.

1.3.1.4 Die subcutane und die intracutane Infektion

Die lokale Reaktion nach einer subcutanen Infektion ist meist gering. Das Virus wandert zum korrespondierenden Ganglion. Neurologische Symptome sind selten. Bei der intracutanen Infektion (155) treten 4 Tage nach der Inokulation lokale Bläschen auf, die in Erosionen oder Ulcerationen übergehen können.

Auch zosteriforme Hautveränderungen können sich entwickeln. Nach etwa 2 Wochen bilden sich die Veränderungen zurück.

1.3.1.5 Die labiale Infektion (148)

Etwa 3 Tage nach labialer Infektion bilden sich lokal eine Schwellung und ein Erythem aus. Kurz darauf entsteht eine Vesikel, die nach etwa einer Woche abheilt. Hohe Raten an persistenter Infektion des Trigeminusganglions sind üblich. Manche Tiere sterben an einer Enzephalitis.

1.3.1.6 Die nasale Infektion (67,194)

Beim Menschen tritt die nasale Infektion vor allem bei Neugeborenen auf. Die nasale Infektion der Maus stellt daher das Modell eines natürlichen Infektionsweges dar. Es kommt hier schnell zu einer Besiedelung der entsprechenden Hirnstammganglien. Der Tod an Enzephalitis ist häufig.

1.3.1.7 Die corneale Infektion (5,175,237)

Einige Tage nach der cornealen Infektion kann man zunächst eine Konjunktivitis beobachten. Zu diesem Zeitpunkt ist die Isolierung des Virus aus der Tränenflüssigkeit möglich. Das Virus gelangt über den N. nasociliaris in das Trigeminusganglion. Demyelinisierungen im Bereich der Trigeminuswurzel sind beschrieben worden. Bei einer Fortsetzung der Wanderung des Virus zeigen die Tiere Gleichgewichtsstörungen und Tremor. Der Tod an Enzephalitis ist möglich.

1.3.1.8 Die Infektion der Ohrwurzel (70,71,158)

Die akute Infektion der Ohrwurzel imponiert lokal durch ein Erythem und eine Schwellung. Das Virus gelangt dann in die oberen Cervicalganglien. Ein Tod an Enzephalitis ist möglich.

1.3.1.9 Die intravaginale Infektion (142)

Als Reaktion auf die lokale Vermehrung des Virus in der Vagina entsteht zunächst eine Vaginitis. HSV wird im Vaginalsekret, im Vaginal- und im Uterusgewebe gefunden. Ab dem 2.-4. Tag nach der Infektion kann das Virus im Rückenmark nachgewiesen werden. Eine aufsteigende Enzephalomyelitis kann die Folge sein. Die Mortalität ist geringer als nach einer i.p.-Infektion. Sporadisch wird das Virus in der Leber oder in der Niere gefunden.

1.3.2 Der Einfluß des HSV-Serotyps auf die Pathogenese

Die Infektion mit HSV-2 hat - unabhängig vom Inokulationsort - eine höhere Mortalität zur Folge als die Infektion mit HSV-1. Nach intravaginaler Infektion gelangt HSV-2 früher ins ZNS, obwohl HSV-1 sich lokal schneller vermehrt. Dagegen bleibt nach intraperitonealer Infektion HSV-2 länger in den viszerale Organen nachweisbar und tritt später im ZNS auf. Bei intracerebraler Infektion vermehrt sich HSV-2 schneller als HSV-1 (25,142).

1.3.3 Die persistente Infektion durch HSV (58,71,103,175,202,218)

Nach der Vermehrung in der Periphèrie gelangt das HSV in die entsprechenden Ganglien des Rückenmarks bzw. der Hirnbasis. Die zentripetale Wanderung in den Axonen sensibler Nerven wird als wichtigster Mechanismus für die Besiedelung der Ganglien angesehen, jedoch werden zusätzlich systemische Ausbreitungswege, lymphogen und hämatogen, diskutiert. Auch während der akuten Infektion der Ganglien erfolgt dort nur eine geringe Vermehrung des Virus.

Die persistente Phase ist definiert durch einen fehlenden direkten Virusnachweis im Ganglienhomogenat und einen positiven Virusbefund bei der Kokultivierung. Für die Entstehung der Persistenz scheint eine vorangehende DNA-Synthese nicht erforderlich zu sein, die Expression der Thymidinkinase (TK) wird für eine produktive Infektion benötigt, nicht dagegen für die Etablierung der Latenz, offenbar jedoch für die Reaktivierung der persistenten Infektion. Die Mechanismen, welche den Übergang der akuten in die okkulte Infektion bewirken, sind wenig bekannt. Immunologische Faktoren sollen eine Rolle spielen. Offenbar kann ein einmal persistent infiziertes Ganglion nicht mehr durch ein anderes Virus superinfiziert werden (58). Entsprechend der Ausdehnung des peripheren Hautareals wird meist nur ein kleiner Prozentsatz der Zellen eines Ganglions infiziert. Der Transcriptionsblock in der okkulten Phase ist bei der Maus vollständig; beim Menschen werden geringe Mengen von m-RNA gebildet. Bisher besteht noch keine Klarheit bezüglich der Form, in der das persistente Virus im Ganglion vorliegt, ob als komplettes Virion, als freie oder als integrierte Nukleinsäure.

Durch bestimmte Reize kann das Virus aus seinem okkulten Zustand in die infektiöse Form rücküberführt werden. Eine derartige Reaktivierung kann auf das Ganglion beschränkt bleiben, kann aber auch von (asymptomatischer) Virusausscheidung (Recurrence) oder von einem klinisch faßbaren Rezidiv (Re-

crudescence) gefolgt sein (248). Geeignete Stimuli, die zur Reaktivierung führen können, sind UV-Bestrahlung, lokale Kältapplikation an die Haut, mechanische Irritationen der Haut durch Abziehen mit Klebestreifen, Schwankungen natürlicher Hormonspiegel, lokale Applikation von Adrenalin und Fieber. Die Wirksamkeit immunsuppressiver Maßnahmen im Hinblick auf eine Reaktivierung des okkulten Virus ist umstritten.

2. Die Reaktionen des Immunsystems bei der HSV-Infektion

2.1 Immunmechanismen allgemein (95)

Das Immunsystem ist ein komplexes System von humoralen Faktoren und zellulären Elementen, sowohl mit Effektor- als auch mit Regulatorfunktionen, welches die Aufgabe hat, die genetisch determinierte Individualität eines vielzelligen Organismus zu erhalten.

Normalerweise besteht gegenüber den meisten antigenen Determinanten des eigenen Organismus immunologische Toleranz: Die Interaktion einer dem "Selbst" zugehörigen Determinante mit dem komplementären Rezeptor auf einer immunkompetenten Zelle bewirkt keine Reaktion des Immunsystems. Alle Gebilde jedoch, die Träger fremder antigenen Determinanten sind und immunogene Potenz besitzen (Bakterien, Viren, Pilze, nicht-autologe Transplantate, veränderte autologe Zellen u.v.a.m.) werden als "Nicht-Selbst" identifiziert. Dann läuft eine Folge von Reaktionen ab (örtliche Akkumulation, klonale Proliferation und Differenzierung immunkompetenter Zellen, Sekretion löslicher Stoffe), deren Ziel es ist, das Fremdgebilde durch Einwirkung zellvermittelter und humoraler Mechanismen zu zerstören und durch Bildung von Gedächtniszellen schneller eine erhöhte spezifische Schlagkraft beim Zweitkontakt zur Verfügung zu haben.

2.1.1 Die Gliederung des Immunsystems (95)

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über wichtige Effektormechanismen des Immunsystems:

	unspezifisch	spezifisch
humoral	Komplement-System Interferone Lysozym	Antikörper
zellulär	Makrophagen "Natural-Killer"-Zellen neutrophile Granulozyten	T-Lymphozyten B-Lymphozyten Mastzellen

Im folgenden sollen nur diejenigen Mechanismen besprochen werden, die für die humorale, Antikörper-vermittelte Immunantwort bedeutsam sind.

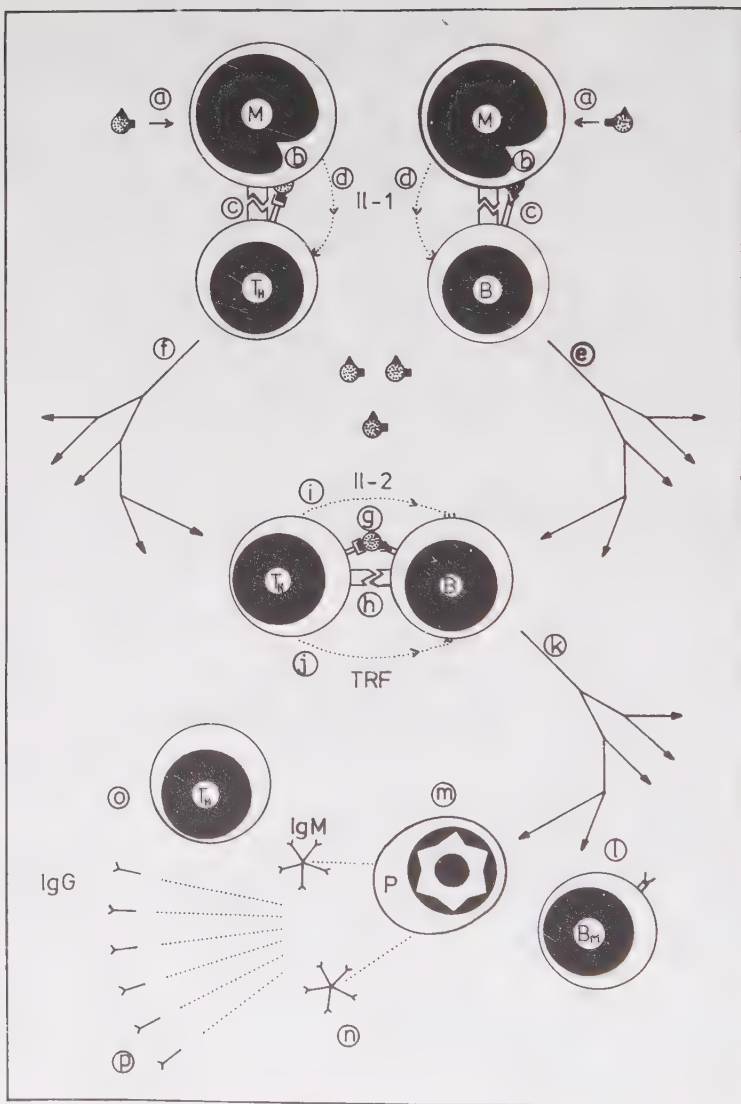
2.1.2 Die Induktion einer Antikörper-Antwort (49,50,81,95)

Nach Kontakt des Immunsystems mit einem Antigen werden immunologische Effektormechanismen als Folge eines komplexen Zusammenspiels verschiedener zellulärer Elemente und deren löslicher Mediatoren ausgelöst. Meist wird zur Einleitung einer Immunantwort gegen ein komplexes Antigen, wie es ein Virus darstellt, die Mitwirkung von T-Lymphozyten benötigt (T-Zell-abhängiges Antigen). Diejenigen Schritte, die eine direkte Zell-Zell-Kooperation erfordern, unterliegen einer genetischen Kontrolle, d.h. sie sind gebunden an das Vorhandensein von "Selbst"-Genprodukten des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Maus: H-2-Komplex, Chromosom 17; Mensch: HLA-Komplex, Chromosom 6), die von den miteinander interagierenden Zellen auf der Oberfläche exprimiert werden müssen.

Nach dem Eintritt des Fremd-Antigens (⊗) in den Organismus wird es zunächst von Makrophagen aufgenommen (a). In den Makrophagen erfolgt eine Verarbeitung (b) des Antigens, wonach dieses in Assoziation mit Ia-Antigen (☐) (H-2-I-A-Genprodukt) an der Oberfläche der Makrophagenmembran erscheint. B-Lymphozyten und T-Helferzellen können es in dieser Form bei einem Kontakt mit dem Makrophagen erkennen (c). Die Lymphozyten erkennen dabei offenbar unterschiedliche Determinanten, die in Anlehnung an Untersuchungen über sehr einfach konstruierte Antigene als Hapten-artige (▲) (von B-Zellen erkannt) und Carrier-artige (⌘) (von T-Helferzellen erkannt) Determinanten bezeichnet werden. Dieser durch Kontakt mit dem Antigen herbeigeführte Stimulus induziert zusammen mit einem weiteren, dem Makrophagen-Sekretionsprodukt Interleukin 1 (Il-1) (d), eine Proliferation der Lymphozyten (e,f).

Einhergehend mit der Proliferation erwerben die T- und B-Lymphozyten einige weitere Eigenschaften: T-Helferzellen können nun Interleukin-2 (Il-2) und einen B-Zell-Differenzierungsfaktor, TRF, sezernieren, während B-Lymphozyten die korrespondierenden Rezeptoren exprimieren. Ein direkter Kontakt von T-Helferzellen und B-Zellen über eine Fremdantigen-Brücke (g) - zwischen dem Hapten-Rezeptor der B-Zelle und dem Carrier-Rezeptor der T-Zelle - und über Ia-Antigene (h) zusammen mit einer Übermittlung der humoralen Signale Il-2 (i) und TRF (j) leiten die endgültige klonale Proliferation und Differenzierung des B-Lymphozyten (k) zur Plasmazelle (m) bzw. zur Memory-B-Zelle (l) ein. Die Plasmazelle synthetisiert und sezerniert dann Antikörper, die zunächst der IgM-Klasse (n) angehören. Eine Umschaltung auf Synthese von Antikörpern der IgG-Klasse (p) erfolgt unter dem Einfluß von T-Lymphozyten (o).

Die eben beschriebenen Mechanismen werden durch das Schema auf der folgenden Seite veranschaulicht.



Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Entstehung einer humoralen Immunantwort
(modifiziert nach 50,81,95)

2.1.3 Die Virusneutralisation (39,124)

Neutralisation bedeutet den Verlust der Infektiosität eines an sich infektiösen Agens als Resultat verschiedener Vorgänge.

Ein Virus kann sich im neutralisierten Zustand nicht mehr in einer Wirtszelle vermehren. Dabei kann die Adsorption an die Zelle bereits behindert sein, jedoch können manche Viren im neutralisierten Zustand noch an die Zielzellen adsorbiert werden, können in das Zellinnere penetrieren, die Hülle ablegen (uncoating) und an den Ort ihrer Replikation gelangen. Je nachdem, wie weit das Virus gelangt, liegt der durch die Neutralisation verursachte Block auf der Ebene eines nachgeschalteten Schrittes im Replikationszyklus. Durch eine Aggregation mehrerer Viren kann die Zahl der infektiösen Teilchen ebenfalls reduziert erscheinen (Pseudoneutralisation).

Die wichtigsten an der Virusneutralisation beteiligten Effektermoleküle sind die Antikörper. Antikörper können Viren allein (direkte Neutralisation) oder im Zusammenwirken mit anderen Faktoren (indirekte Neutralisation) neutralisieren. Bei der indirekten Neutralisation ist das Virus nach der Bindung der Antikörpermoleküle noch infektiös. Erst durch die zusätzliche Bindung von Komplement, Coombs-Serum, Rheumafaktor oder Staphylococcus aureus Protein A wird hier die Infektiosität reduziert.

Die Kinetik des Neutralisationsvorganges (37,254) ist davon abhängig, ob zur Neutralisation des Virus die Besetzung von nur einer oder aber von mehreren Stellen auf der Oberfläche durch den Antikörper erforderlich ist. Der Abfall der Zahl von infektiösen Teilchen folgt unmittelbar einer fallenden Exponentialfunktion, sofern nur eine antigene Determinante besetzt werden muß. Erfolgt hingegen die Neutralisation erst nach der Bindung vieler Antikörpermoleküle, so ist der exponentielle Rückgang der Zahl infektiöser Teilchen erst nach einer Latenzzeit nachweisbar, welche der Zahl der Bindungsstellen proportional ist. Die Geschwindigkeit der Neutralisa-

tionsreaktion ist der Antikörperkonzentration proportional. Offenbar läuft sie in 2 Stufen ab: Zunächst findet eine schnellere, durch Verdünnung auftrennbare Bindung der Antikörper, später eine irreversible, langsamere Bindung statt.

Die Virusneutralisation kann als sterisches Phänomen aufgefaßt werden. Durch die Bindung der Antikörper an Strukturen auf der Virusoberfläche wird die Interaktion von virusseitigen Rezeptoren mit Komplementärstrukturen auf den Zellen verhindert. Ein derartiger Mechanismus würde die Bindung vieler Antikörpermoleküle verschiedener Spezifität an vielen kritischen Punkten im Sinne eines "Multi-Hit"-Phänomens erfordern. Bei anderen Viren verläuft die Neutralisation als aktiver Prozeß, der durch die Bindung nur eines oder zumindest im Vergleich zur Gesamtzahl der Rezeptoren sehr weniger Antikörpermoleküle ausgelöst wird ("Single-Hit") und zu physikochemischen Veränderungen an der Hülle oder am Capsid führt. Diese Veränderungen können auch die Aktivität von viruseigenen Enzymen, welche für die Replikation erforderlich sind, hemmen. Die Konformationsänderungen von viralen Strukturproteinen nach der Bindung erster Antikörpermoleküle legen neue antigene Determinanten frei, die entsprechend von Antikörpern anderer Spezifität besetzt werden können. Es scheint von den Eigenschaften des Virus abzuhängen (Vorhandensein einer Hülle, Capsidarchitektur), welcher der diskutierten Mechanismen ablaufen wird.

In Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Infektion findet eine "Reifung" der Antikörper hinsichtlich ihres Verhaltens bei der Virusneutralisation statt: der Prozentsatz an nicht-neutralisiertem Virus und die Komplementabhängigkeit der Antikörper sinken ab.

2.2 Immunologische Befunde bei Herpesinfektionen

2.2.1 Die angeborene Resistenz

Die angeborene Resistenz eines Tieres umfaßt alle diejenigen Faktoren, welche der Etablierung und Ausbreitung einer Virusinfektion hinderlich sind und welche unmittelbar nach Eintritt des Virus in den Wirtsorganismus wirksam werden können. Vergleicht man verschiedene Mäuseinzuchtstämme hinsichtlich der Letalität primärer HSV-1-Infektionen, so ergeben sich deutliche Differenzen (118,256). Auch die Rate des Auftretens latenter Infektionen ist bei Stämmen unterschiedlicher Resistenz variabel (186), während eine solche Abhängigkeit bezüglich der Vermehrung des Virus bei der akuten Infektion des Ganglions nicht gefunden wird (33). Schließlich kann eine gesteigerte Resistenz sich auf einen bestimmten Inokulationsort beschränken (98). Ein Aspekt der Resistenz könnte der Grad der Permissivität der Wirtszellen für die Replikation von HSV sein. HSV-1 vermehrt sich bei jeweils gleicher Adsorption besser in Zellkulturen von in vivo HSV-sensiblen Mäusstämmen als in Zellen resistenter Mäuse (32). Diese Resistenz wird rezessiv vererbt. Bei Verwendung von Embryofibroblastenkulturen sind die Ergebnisse widersprüchlich (32,118,136). Die in vivo Resistenz der Maus gegen HSV-1-Infektionen wird dominant durch zwei nicht H-2-assoziierte Gene vererbt; zusätzliche Gene scheinen die Resistenz zu modulieren (118,121). Die Träger dieser Resistenz sollen aus dem Knochenmark stammen; man vermutet, daß es sich um Natural-Killer- (NK) Zellen handelt (119,122), deren Aktivität Fremdanigen-unspezifisch und nicht durch Transplantationsantigene restringiert ist. Solche NK-Zellen zeigen relativ früh nach einer Infektion mit dem HSV eine Aktivitätssteigerung, die sich bei Mäusen, aber auch bei menschlichen Herpespatienten nachweisen läßt (7,29,105,199). Man hat Anhaltspunkte dafür, daß Interferon an der Regulation der Aktivität von NK-Zellen beteiligt ist (56). Zur effektiven NK-Lyse HSV-infizierter Zellen ist das Vorhandensein eines

nonviralen zelleigenen Rezeptors auf der Zielzelle erforderlich; eine Bindung über HSV-Antigene scheint nicht ausreichend zu sein (246). Einige Untersuchungen sowohl mit adoptivem Transfer NK-haltiger Zellpopulationen als auch an ^{89}Sr -behandelten Tieren, bei denen das Knochenmark zerstört ist, und mit NK-defizienten Chédiak-Higashi-("beige")-Mäusen haben jedoch Zweifel am protektiven Beitrag der NK-Zellen im Rahmen von HSV-Infektionen aufkommen lassen (7,147).

Eine wichtige Bedeutung für die in vivo Resistenz gegen HSV-1-Infektionen kommt offenbar den Interferonen (IFN) zu (32,64, 151). Insbesondere scheint die Fähigkeit, früh nach der Infektion (4-8 h) hohe IFN-Spiegel produzieren zu können, mit der Resistenz korreliert zu sein. Interferonaktivität kann im Serum HSV-infizierter Mäuse und in den Überständen von HSV-infizierten Milzzell- und Peritonealmakrophagen-Kulturen nachgewiesen werden (219,256). Stets zeigen HSV-resistente Mäusestämme nach der Infektion hohe IFN-Titer, während die Werte bei HSV-empfindlichen Mäusen sehr gering ausfallen (179,255, 256). In vitro getestete HSV-Stämme erwiesen sich als IFN-sensibel, wenn auch nicht in dem Maße wie etwa das Vesicular stomatitis-Virus (83,117). Innerhalb eines HSV-Serotyps differierte die Ansprechbarkeit kaum, jedoch schienen HSV-2-Stämme weniger IFN-empfindlich zu sein (8,83).

Als wichtigste Leistung der Resistenzfaktoren muß die Verhinderung des Befalls des zentralen Nervensystems, der Entstehung einer Enzephalitis und der Etablierung einer persistenten Infektion betrachtet werden.

2.2.2 Zelluläre Immunmechanismen

Die Bedeutung zellulärer Immunmechanismen für die Abwehr von HSV-Infektionen wird durch Studien dokumentiert, in denen durch adoptiven Transfer von immunen Milzzellen der letale

Ausgang der Infektion verhindert werden konnte (51,80,250); außerdem wurde die Virusclearance aus den viszerale Organen beschleunigt (140).

2.2.2.1 Makrophagen

Fremdantigen-unspezifische Makrophagen werden als erste Verteidigungsbarriere gegen HSV-Infektionen angesehen (138,145, 258). Die protektive Aktivität ist erst ab einem Alter der Mäuse von mehr als 4 Wochen nachweisbar (77,138).

In-vitro-Studien haben gezeigt, daß die Virusvermehrung in Fibroblasten durch "extrinsische" Leistungen von Makrophagen in der Kultur deutlich reduziert wurde. Als Mediatoren dieser "extrinsischen" Makrophagenaktivität (145) werden Interferone oder zytotoxische Faktoren diskutiert (143,208). Eine gesteigerte Wirksamkeit der Makrophagen konnte nachgewiesen werden, wenn man Effektorzellen einsetzte, die zwischen dem 3. und dem 7. Tag nach einer in-vivo-Infektion mit HSV-2 gewonnen wurden (146).

Neben der extrinsischen ist auch eine "intrinsische" Makrophagenaktivität (145) beschrieben worden, welche die Fähigkeit der Makrophagen zur zellinternen Restriktion der Virusvermehrung bezeichnet (18,145). Die Permissivität der Makrophagen bezüglich der HSV-Replikation ist abhängig vom Mäusestamm und vom Aktivierungszustand der Zellen. Einerseits nimmt sie mit zunehmender Dauer der in-vitro-Kultivierung ab (120), andererseits vermehrt sich das Virus primär besser in Makrophagenkulturen von in vivo HSV-empfindlichen Mäusestämmen (BALB/c, DBA, AKR) als in Kulturen HSV-resistenter Tiere (C57BL/6) (41,219).

Das Auftreten der vorwiegend durch HSV-2 hervorgerufenen fokal-nekrotisierenden Hepatitis korreliert offenbar mit dem Unvermögen der Makrophagen bestimmter Mäusestämme die Virusvermehrung zu restringieren. Diese Restriktionsfähigkeit wird X-gekoppelt dominant vererbt (134,136).

Die Zerstörung der Makrophagen durch eine Verabreichung von Antimakrophagenserum oder von Silicagel steigert die Schwere von HSV-Infektionen und die Letalität deutlich (128,137,138, 208,258).

2.2.2.2 T-Lymphozyten

In-vitro-Untersuchungen haben ergeben, daß nach einer primären Infektion mit dem HSV virusspezifische, H-2 K(D)-restringierte zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) ($\text{Lyt } 2^{+}3^{+}$) auftreten, die sich vom 3. Tag p.i. an nachweisen lassen und die eine maximale Aktivität zwischen dem 5. und 8. Tag i.p. aufweisen (90,113,160,182,183). Etwa 1 von 5000 Milzzellen vermag in der Zeit maximaler CTL-Aktivität HSV-infizierte Zellen zu lysieren (205). Zu ihrer Induktion sind die Mitwirkung von Ia^{+} -Makrophagen (Interleukin-1-Sekretion) und antigenspezifischen Helfer-T-Zellen (Interleukin-2-Sekretion) erforderlich (204,209,210,243). Die Zielantigene der CTL sind die HSV-kodierten Glykoproteine, insbesondere gB und gC (28, 45,60,112,114). Sowohl HSV-1 wie HSV-2 vermögen zytotoxische T-Lymphozyten zu induzieren. Die CTL-Aktivität zeigt deutliche Kreuzreaktionen (50-70 %) gegenüber beiden Serotypen (24,45, 242). In vivo konnte durch adoptiven Transfer HSV-immuner Milzzellen mit H-2 K/D-Kompatibilität eine Protektion von kurzer Dauer erzielt werden. Gute langdauernde Protektion gegen HSV wurde durch H-2 (I-A)-kompatible T-Zellen ermöglicht (80), die eine Helferfunktion nicht nur für die Vorläuferzellen von zytotoxischen T-Zellen, sondern auch für die B-Zellen, für die Reaktionen vom verzögerten Typ (DTH)-vermittelnden T-Zellen oder für die Aktivierung von Makrophagen ausüben. In Mäusen, die mit Anti-Lymphozyten-Serum vorbehandelt waren, war die Letalität gesteigert (258).

Neben zytotoxischen T-Lymphozyten wurden H-2 (I-A)-restringierte T-Zellen beschrieben, welche Reaktionen vom verzögerten Typ (DTH) vermitteln (24,161). 4 bis 5 Tage nach einer

HSV-Infektion (intracutan) wird die DTH-Aktivität meßbar. Sie erreicht maximale Werte 8 bis 12 Tage nach der Infektion und ist noch 18 Monate später nachweisbar (148,158,160). Als Suppressoren der HSV-spezifischen DTH wurden sowohl B- als auch T-Lymphozyten identifiziert (4,159).

2.2.3 Humorale Immunmechanismen

2.2.3.1 Antikörper (28,78,148,259)

Etwa zur gleichen Zeit wie die spezifischen zellulären Mechanismen treten nach der Infektion mit dem HSV spezifische antivirale Antikörper (AK) auf (23,33,201).

Die Antikörperbildung gegen HSV ist T-Zell-abhängig (20). T-Zell-defiziente Nacktmäuse bilden deshalb auch nach mehrfacher Immunisierung nur marginale Mengen an HSV-Antikörpern (155). Die Bildung von Antikörpern erfolgt als Antwort auf infektiöses Virus, aber auch auf verschiedene nicht-infektiöse Viruspräparationen. Hier sind UV-inaktiviertes Virus, Formalin-behandeltes Virus (6) und gereinigte HSV-Glykoproteine (28) zu nennen. Die Immunogenität der Glykoproteine kann durch ihre Inkorporation in Liposomen und durch Zusatz von Lipid-A stark gesteigert werden (162). Die Zielepitope der Antikörper sind von denen der zytotoxischen T-Lymphozyten offenbar verschieden (60).

Untersuchungen hinsichtlich der Spezifität von Antikörpern, die nach HSV-Infektionen gebildet werden, haben unter Verwendung von Seren menschlicher Herpespatienten gezeigt, daß Immunglobuline mit Spezifitäten für mindestens 18 HSV-codierte Proteine auftreten, zu denen die Hauptglykoproteine und das Hauptcapsidprotein gehören. Die höchsten Antikörpertiter waren gegen Proteine der Virushülle, speziell gegen Glykoprotein gB vorhanden (46,93,259). Bei Patienten mit häufigen

Rezidiven fanden sich keine Unterschiede im AK-Muster vor und nach dem Rezidiv (126), hingegen zeigten sie einen erhöhten Anteil der neutralisierenden AK an den im RIA nachweisbaren Herpes-Gesamtantikörpern (190). In einigen Fällen schienen Komplikationen bei Primärinfektionen und gehäufte Rezidive mit dem Fehlen von HSV-spezifischem IgA vergesellschaftet zu sein (236).

Es wird angenommen, daß die Neutralisation von HSV das Ergebnis eines "Single-Hit"-Mechanismus ist (254). Andererseits ist von verschiedenen Autoren betont worden, daß die Neutralisation - besonders durch Seren, die früh nach Infektion gewonnen wurden - nur in Gegenwart von Komplement möglich ist (34,66,75,173,211,244,253). So können durch ein spezifisches IgM sensibilisierte HSV-Virionen durch optimale Konzentrationen von C1 und C4 neutralisiert werden; bei suboptimalen Konzentrationen dieser beiden Komponenten bewirken optimale Konzentrationen von C2 und C3 eine Neutralisation. Die terminalen Komplementkomponenten (C5 bis C9) sind für die Neutralisation von HSV offenbar nicht erforderlich (35). Nach Inkubation von HSV mit spezifischen Antiseren können noch infektiöse, "sensibilisierte" Teilchen gefunden werden, deren Infektiosität erst durch die Zugabe eines Coombs-Serums beseitigt wird (9). Für die Neutralisation ist nach anderen Publikationen das Fc-Stück des Antikörpermoleküls nicht wichtig, da $F(ab')_2$ -Stücke spezifischer HSV-AK in der Lage sind, HSV-Viria zu neutralisieren (172).

Die Bedeutung der Antikörper für die Bewältigung einer experimentellen HSV-Infektion der Maus ergibt sich einerseits aus ihrer Fähigkeit zur Virusneutralisation, andererseits aus der Möglichkeit, im Zusammenwirken mit Komplement oder mit verschiedenen Fc-Rezeptor-tragenden Zellen eine Lyse HSV-infizierter Zellen zu initiieren.

In vivo ist die reine Virusneutralisation durch Antikörper einerseits relevant in der Frühphase von (exogenen oder endogenen) Reinfektionen mit HSV, andererseits können ausreichende

Antikörperkonzentrationen die hämatogene oder lymphogene Disseminierung von freiem Virus verhindern. Die lokale Ausbreitung des HSV kann durch Antikörper nicht unterbunden werden, da das Virus sich von Zelle zu Zelle ausbreiten kann, ohne den Extrazellularraum passieren zu müssen (116) und intrazelluläres Virus durch AK nicht erreichbar ist. Hingegen ist ein gewisser Einfluß der Antikörper auf die Vermehrung und die Ausbreitung von HSV in den Spinalganglien peripher infizierter Mäuse denkbar. Das Auftreten von Virus in den Spinalganglien ist begleitet von einem Infiltrat, welches größtenteils aus Zellen besteht, die sowohl auf ihrer Oberfläche als auch im Zytoplasma Immunglobuline zeigen. Dieses Infiltrat tritt bei HSV-resistenten Mäusestämmen früh auf und ist hier stark ausgeprägt (33). Andererseits kann in immunisierten Mäusen trotz hoher Spiegel an neutralisierenden Antikörpern noch eine latente Infektion der Ganglien entstehen (185). Durch mehrfache Behandlung mit einem Anti-IgM-Serum kann die Zahl der B-Lymphozyten in der Maus vorübergehend stark gesenkt werden. Diese Mäuse zeigen dann einen veränderten Verlauf der HSV-Infektion. Während die DTH normal und die Viruselimination lokal (z.B. nach Infektion in die Ohrwurzel) unbeeinflusst bleibt, ist die akute entzündliche Reaktion lokal verringert, in den Ganglien kann mehr infektiöses Virus nachgewiesen werden, und die Zahl latent-infizierter Ganglienzellen nimmt zu. Neutralisierende Antikörper fehlen wie erwartet (94).

In zahlreichen Experimenten ist gezeigt worden, daß passiv zugeführte spezifische Herpes-Antiseren einen blockierenden Einfluß auf den Infektionsverlauf haben und daß die Letalität der Infektion vermindert wird (12,155,186,214,250,251). Analoge Ergebnisse wurden durch Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen HSV-codierte Glykoproteine erzielt, auch wenn diese AK in vitro HSV nicht immer neutralisieren konnten (11).

Der Stellenwert des Befundes, daß nach lokaler passiver Antikörperzufuhr in den drainierenden Lymphknoten HSV-spezifische T-Lymphozyten nachgewiesen werden können (220), ist noch nicht

klar. Nach passiver Immunisierung mit Antikörpern ist die Virusvermehrung geringer, und die zosteriforme Ausbreitung der Primärläsion nach intracutaner Infektion wird reduziert (155). Bei frühzeitiger Antikörperzufuhr (2 (bis 4) Tage p.i.) kann ein Übergreifen der Infektion auf das zentrale Nervensystem weitgehend verhindert werden; die Rate latenter Infektionen ist dann auch geringer (129,148,170,250), ebenso wie die Reaktivierbarkeit von bereits latentem Virus (102, 233). Bis zu 8 Stunden p.i. kann eine Protektion durch Verabfolgung von $F(ab')_2$ -Stücken spezifischer HSV-Antikörper erzielt werden, später sind nur noch intakte AK-Moleküle wirksam (172). Bezüglich der Wirksamkeit passiv zugeführter Antikörper nimmt die Infektion der Cornea eine Sonderstellung ein: Durch eine sehr frühzeitige Verabreichung von Antiserum (innerhalb von 8 h p.i.) kann die Ausbreitung des Virus in das ZNS nicht beeinflusst werden (36). Die Rate latenter Infektionen ist gesteigert (186), hingegen besteht Schutz gegen einen tödlichen Ausgang der Infektion. Eine passive Zufuhr von Antikörpern der IgG-Klasse, die von der Mutter zum Foeten (diaplazentar) bzw. zum Neugeborenen (durch die Brustmilch) erfolgt, schützt Neugeborene vor schwerverlaufenden Erkrankungen, wie sie durch HSV-Infektionen sub partu entstehen können (74,252). Während der Schwangerschaft haben HSV-spezifische Antikörper in der Amnionflüssigkeit eine protektive Wirkung (26).

HSV-spezifische Antikörper besitzen zwar die Fähigkeit zur Neutralisation von freiem Virus, jedoch sind sie allein ohne Wirkung, wenn eine Zelle erst einmal infiziert ist. Es konnte allerdings demonstriert werden, daß in der HSV-infizierten Gewebekultur die Plaquegröße etwas reduziert wurde, während die Ausbreitung der Riesenzellen in Gegenwart von HSV-Antikörpern zunahm (51). Zur Lyse von HSV-infizierten Zellen benötigen Antikörper die Kooperation bestimmter Zellen oder des Komplementsystems. Die Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen Weg erfolgt nach Bindung der Antikörper an die

Glykoproteine gB, gC oder gD (166). B-Zellen aus der Milz HSV-immuner Mäuse können in Anwesenheit von Komplement in vitro die Lyse HSV-infizierter Zellen einleiten (7).

2.2.3.2 Die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) (141,181,202)

Neben ihrer Fähigkeit zur Virusneutralisation und zur Initiierung der Komplement-vermittelten Lyse HSV-infizierter Zellen besitzen Antikörper auch noch die Möglichkeit, im Zusammenwirken mit entsprechenden unspezifischen Effektorzellen HSV-infizierte Zellen zu zerstören (104,141,222). Die Fähigkeit zur ADCC wird von experimentell infizierten Mäusen bis zum 5. Tag nach der HSV-Infektion erworben (148); die beteiligten Antikörper gehören zum größten Teil der IgG-Klasse an (222). Durch die Bindung der Antikörper wird die Zielzelle für die Leistung der Effektorzellen sensibilisiert. Die Kontaktaufnahme der Effektoren mit der Zielzelle erfolgt offenbar über das Fc-Stück des gebundenen Antikörpermoleküls (130). Um die Zielzelle erfolgreich lysieren zu können, benötigt die Effektorzelle einen funktionstüchtigen Energiestoffwechsel und ein intaktes Zytoskelett; die Fähigkeit zur Proteinsynthese ist hingegen nicht erforderlich (226). Die Zielantigene der ADCC sind die HSV-codierten Glykoproteine in der Membran der infizierten Zellen, die ab 4 h p.i. nach der Umsetzung von genetischer Information des Virus durch die Zelle exprimiert werden (166,223). 10 bis 30 % der maximal meßbaren ADCC-Aktivität - gegen adhärrierendes oder unvollständig penetriertes Virus auf der Zelloberfläche - läßt sich schon 2 h p.i. nachweisen (168,225).

Den Effektorzellen für ADCC fehlen die Charakteristika von T- oder B-Lymphozyten. Sie besitzen jedoch teilweise Fc-Rezeptoren und werden den "K"-Zellen oder den "Null"-Zellen zugeordnet (224). Bei Rindern konnten auch gelapptkernige

Leukozyten als Effektorzellen identifiziert werden (65,66), deren Wirksamkeit durch Komplement gesteigert wurde (203). Mögliche Initiations- oder Regulatorfunktionen bezüglich der ADCC werden Makrophagen (187) oder T-Lymphozyten (169, 171) zugeschrieben. In geeigneten Transfersystemen konnte gezeigt werden, daß ADCC-Mechanismen den Krankheitsverlauf nach HSV-Infektionen der Maus abschwächen bzw. die Letalität zu senken vermochten (36,170,171,174,187). Die ADCC-Tests eignen sich auch als in vitro Systeme zum Nachweis von sowohl sehr geringen Mengen an HSV-spezifischen Antikörpern als auch von niedrigen Quantitäten von HSV-Antigenen in der Membran infizierter Zellen frühzeitig nach einer Infektion.

2.2.4 Immunologische Aspekte der Persistenz und der Reaktivierung

Die experimentellen Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit immunsuppressiver Maßnahmen zur Reaktivierung von HSV sind widersprüchlich. Während einerseits Azathioprin, Cyclophosphamid oder Antilymphozytenserum nur eine geringfügige Steigerung der durch Klebeband-Stripping (Ohrmodell) erzielten Reaktivierung bewirkten (14), konnten andererseits Manipulationen wie Röntgenbestrahlung, Prednisonbehandlung und in diesem Modell auch Cyclophosphamidgabe (174,241) Reaktivierungsraten zwischen 30 und 70 % hervorrufen. Dagegen ist die Reaktivierung von persistentem HSV in der Gegenwart von spezifischem Immunserum in vivo und in vitro herabgesetzt (188, 233). Die Zahl der persistenten Infektionen konnte durch eine passive Gabe von Antikörpern an infizierte Tiere zwar nicht verhindert, immerhin jedoch reduziert werden (102,103,218). In einem Meerschweinchenmodell ging die Manifestation eines Rezidivs einher mit dem Auftreten von Suppressorzellen für die HSV-stimulierte Lymphoproliferation, die möglicherweise durch das reaktivierte Virus induziert worden war (89).

3. Problemstellung der Arbeit

Die Arbeiten über die unspezifischen Resistenzfaktoren und die spezifischen Immunmechanismen bei der Bewältigung von Infektionen mit dem Herpes simplex Virus haben sich bisher besonders auf die zellulären Effektoren konzentriert. Dagegen existieren keine präzisen Untersuchungen über die spezifischen humoralen Mechanismen, obwohl in der Humanmedizin die Bestimmung der Serumantikörper heute das gängigste Verfahren zur Sicherung der Diagnose einer HSV-Infektion darstellt. Außerdem mehrten sich in der Literatur die Hinweise, daß humorale Antikörper einen protektiven Einfluß auf HSV-Erkrankungen haben können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, anhand eines Modellsystems, der mit HSV-1 primär infizierten Maus, grundsätzlich den Einfluß von bestimmten Viruseigenschaften, von den Infektionsbedingungen, von unterschiedlichen physiologischen Faktoren und von immunologischen Parametern auf das Ausmaß der HSV-1-spezifischen Antikörper-Bildung zu untersuchen. Darüber hinaus sollten verschiedene immun-modulatorisch wirksame Substanzen hinsichtlich ihrer Interaktionen mit dem Antikörper-bildenden Apparat bei HSV-1-Infektionen untersucht werden.

Die Arbeit sollte so einen Beitrag leisten zum besseren Verständnis der humoralen Immunreaktion bei Herpes simplex Infektionen, besonders für die hierbei wirksamen Regulationsmechanismen und deren Beeinflußbarkeit durch immunotrope Agentien. Außerdem sollten Basisdaten für weitergehende Untersuchungen über die Antikörper-Bildung bei experimentell mit dem HSV infizierten Mäusen gewonnen werden.

B. Material und Methoden

Die Untersuchung verschiedener Aspekte der Antikörperbildung nach HSV-1-Infektionen bei Mäusen erforderte einerseits die Arbeit mit dem in-vivo-System "Maus", andererseits die Verwendung von in-vitro-Testsystemen zum Nachweis der Serum-AK, zur Bestimmung des Virusgehalts bestimmter Organproben infizierter Tiere und zur Gewinnung diverser Sekretionsprodukte von immunologisch relevanten Mäusezellen.

1. Zellkultur

Methoden zur Kultivierung eukaryoter Zellen wurden erstmals von Harrison (73) beschrieben. Umschriebene zytopathische Effekte in in-vitro-Kulturen einschichtiger "Monolayer"-Zellen wurden erstmals von Dulbecco (42) beobachtet. Man unterscheidet je nach Wachstumscharakteristika Suspensionskulturen (die Zellen schwimmen frei im Medium) und "Monolayer"-Kulturen (eine Lage von Zellen ist auf einer Glas-/Kunststoffoberfläche festgewachsen) und nach Lebensdauer und "Sozialverhalten" primäre (frisch aus einem trypsinierten Organ hergestellt), sekundäre (aus primären Kulturen durch Umsetzen hergestellt) und kontinuierliche (die Zellen teilen sich permanent, Eigenschaften von Tumorzellen) Zellkulturen.

1.1 Kulturmedien

Es wurden handelsübliche Kulturmedien der Rezepturen TCM 199, GMEM (beide GIBCO, Paisley, Schottland), BME (Flow, Glasgow, Schottland), die Hanks' Salzlösung und als Lahn-Medium die Hanks' Lösung mit 0,25 % Laktalbumin (Difco, Detroit, Mich., USA) verwendet. Vor Gebrauch wurden die Medien (außer Hanks' Lösung) mit 10 % inaktiviertem Kälberserum angereichert.

Außerdem wurden Antibiotika (0,2 Mega Penicillin/l und 0,2 g Streptomycin/l) und Natriumbicarbonat (0,5 bis 1,0 g/l) zugesetzt.

1.2 Zellen

1.2.1 Kaninchennieren-Zellen

Die aus 1-Woche-alten Baby-Kaninchen steril entnommenen Nieren wurden zunächst zerkleinert und dann durch Inkubation in einer Phosphat-gepufferten NaCl-Lösung mit 0,05 % Trypsin (Fa. Merck, Darmstadt) in Einzelzellsuspensionen überführt. Die Zellen wurden ausgeschleudert, in Lahn-Medium aufgenommen, in Roux-Flaschen ausgesät und bei 37°C gehalten.

1.2.2 Mäuseembryo-Fibroblasten

Nach sorgfältiger Desinfektion des Fells mit 70 %igem Alkohol wurde einer schwangeren Maus (16.-20. Schwangerschaftstag) steril der Uterus entnommen und in eine Petrischale mit steriler Hanks'-Lösung gebracht. Hier wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert. Placenta und Eihäute wurden entfernt und die Embryonen in eine Petrischale mit frischer Hanks'-Lösung überführt. Nun wurden Kopf, Schwanz und Extremitäten abgetrennt, bei großen Embryonen die Baueingeweide abgesaugt, und das verbleibende Gewebe in einem frischen Gefäß zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in Trypsinlösung suspendiert und in einem Trypsiniergefäß bei 37°C unter ständigem Rühren in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation in Lahn-Medium suspendiert und in Roux-Flaschen ausgesät.

1.2.3 Vero-Zellen

Vero-Zellen sind eine kontinuierliche Linie von Affennieren-Zellen. Konfluente Kulturen wurden mit Trypsin von der Unterfläche abgelöst. Durch mehrfaches Ansaugen und Ausblasen mit der Pipette wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden ausgeschleudert, in TCM 199 resuspendiert und in geringerer Dichte in neue Roux-Flaschen ausgesät.

1.2.4 BHK-Zellen

Zellen der kontinuierlichen Linie BHK 21 (Baby hamster kidney) wurden in GMEM gehalten.

1.2.5 Gebrauchsansätze für Zellen

Zur Durchführung der Titrationen von Virus-Pools oder des Virusgehalts von Mäuseorganen und von Neutralisationstests wurden die entsprechenden Zellen abtrypsiniert, ausgeschleudert, in dem jeweiligen Medium resuspendiert, und auf Rollrandröhrchen (z.B. $\sim 2-3 \times 10^5$ Vero/RR) oder Mikrotiterplatten ($1-2 \times 10^5$ Vero/Well) ausgesät.

2. Viren

Für alle Versuche wurde Herpes simplex Virus Typ 1 verwendet, in den meisten Fällen der Stamm Lennette (Len) (52). Außerdem wurden die Stämme IES (52), HFEM (63), WAL (217), ANG (217) und ANG path (92) hinsichtlich der in der Maus induzierten Antikörperantwort getestet.

In einer Reihe von Versuchen verabreichten wir eine durch Formalin inaktivierte HSV-1 Vakzine, die von Dr. S. Dundaroff,

Varna, Bulgarien, hergestellt wurde (6). Das lysophilisierte Material (1 mg/Ampulle) wurde in Aqua bidest. gelöst. Pro Maus wurde ein Drittel des Ampulleninhalts injiziert.

2.1 Viruszüchtung

Das Virus wurde auf KaN-, BHK- oder Vero-Zellen vermehrt. Nach der Infektion eines konfluenten Zellrasens (ca. 20×10^6 Zellen/Roux-Flasche) mit ca. 10^6 PFU des zu vermehrenden Virus war der zytopathische Effekt nach zweitägiger Inkubation bei 37°C komplett. Durch kräftiges Schütteln der Kulturflasche wurden die Zellen von der Unterlage abgelöst. Gegebenenfalls wurde der Inhalt mehrerer Roux-Flaschen, die mit dem gleichen Virus infiziert waren, gepoolt. Die Virus-Zell-Suspension wurde in geeigneten Portionen bei -70°C eingefroren.

2.2 Titration von Virus-Pools

Die zu titrierende Probe wurde rasch aufgetaut und steril in ein Zentrifugenglas auf Eis überführt. Zur Freisetzung des intrazellulären Virus (70-80 %) wurde die Virus-Zell-Suspension mit einem Branson-Sonifier cell disruptor B 15 (output control: 4; 40 % duty cycle) 6 Pulse lang beschallt. Größere Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation 5 min bei 1500 g abgeschleudert. Der virushaltige Überstand wurde 10^1 -, 10^2 - bis 10^6 -fach verdünnt. Je 0,2 ml aus jeder Verdünnung wurden auf Rollrandröhrchen überimpft. Zwei bis 3 Stunden später wurden 0,2 ml verdünntes Humanserum mit Anti-HSV-AK zugegeben (siehe B.4.1.1). Nach zweitägiger Inkubation bei 37°C wurden die zytopathischen Effekte (Plaques oder Riesenzellen) gezählt. Der Virustiter wurde als Zahl der gezählten Plaques (plaque-forming-unit = PFU) multipliziert mit dem Wert der entsprechenden Verdünnung bezogen auf 0,2 ml angegeben.

3. Durchführung der Mäuseversuche

3.1 Mäuse

Mäuse des Auszuchtstammes NMRI wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierforschung, Hannover, oder von der Fa. Dr. Ivanovas, Kisslegg, Allgäu, bezogen. Vom Transport bis zum Versuchsbeginn konnten sich die Tiere mindestens eine Woche lang akklimatisieren. Für einige Versuche war der Einsatz von Inzucht-Mäusen erforderlich. Diese Tiere entstammten den Zuchten des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und des Instituts für Immunologie der Universität Mainz. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen gehalten. Bei Versuchsbeginn hatten die Tiere ein Alter von 6 bis 9 Wochen.

3.2 Injektionen/Infektion

Wirksubstanzen oder Virus wurden intraperitoneal (0,2 ml), intraplantar (0,1 ml), intramuskulär (0,1 ml) (in den Unterschenkel oder den Oberschenkel) oder subcutan (0,2 ml in eine Hautfalte im Genick) verabreicht.

3.3 Gewinnung von Blutproben

Zur Gewinnung ausreichender Volumina von Mäuseblut für serologische Untersuchungen wurde mit Äther eingeschläfertem Mäusen ein Auge entfernt. Hierdurch entstand eine Blutung aus retrobulbären Venengeflechten. Das Blut wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen.

3.4 Behandlung der Blutproben

Das gewonnene Blut gerann bei 4°C über Nacht oder bei 37°C für 2 Stunden. Durch Zentrifugieren wurden die korpuskulären

Bestandteile pelletiert. Das Serum im Überstand wurde abgenommen, in ein frisches Gefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt.

Zur Gewinnung der IgM-Fraktion wurden Mäuseseren über DEAE-Sephacel Minisäulen (Viramed, München) chromatographiert. Das Eluat enthielt in einer Verdünnung von 1:8 die Antikörper der IgM-Klasse.

3.5 Peritonealexsudatzellen: Gewinnung, Kulturüberstände, Titration und HSV-Antigennachweis durch den Antikörperproduktionstest

Nach sorgfältiger Desinfektion des Fells mit 70 %igem Alkohol wurde das Fell über dem Bauch in der Mittellinie in einer abgehobenen Längsfalte mit einem Querschnitt durchtrennt. Die Bauchmuskulatur wurde durch Zug am oberen und unteren Schnittrand in kranialer und kaudaler Richtung freigelegt. Durch eine Kanüle wurden 5 ml kaltes BME-Medium mit 5 E Heparin/ml (Liquemin®, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) in die Bauchhöhle injiziert und kurz darauf wieder abgezogen. Waschflüssigkeit von mehreren Mäusen wurde in einem sterilen Gefäß auf Eis gepoolt.

Zur Reinjektion in syngene Mäuse wurden die Zellen ausgeschleudert und in $\frac{1}{20}$ des Ausgangsvolumens BME ohne Heparin resuspendiert.

Die Herstellung von Makrophagenkulturen erfolgte durch ein Aussäen der Zellsuspension auf Petrischalen (Fa. Greiner, Nürtingen). Nach 2 Stunden wurden nichtadhärente Zellen durch viermaliges kräftiges Waschen entfernt. Die verbleibenden adhärennten Zellen konnten aufgrund ihrer Morphologie (Pappenheimfärbung) und Phagozytosefähigkeit zu über 95 % als Makrophagen angesehen werden.

Die Kulturüberstände der Peritonealmakrophagen wurden 24 Stunden nach Entfernung der nichtadhärennten Zellen zu Unter-

suchungen auf das Vorhandensein von Aktivitäten, welche die Antikörperantwort in vivo modulieren, gewonnen. Vor der Injektion in HSV-infizierte Mäuse wurden die Überstände für 10 min bei 2500 g zentrifugiert, um Kontaminationen von intakten Zellen, von Zelltrümmern oder von Silikatpartikeln zu entfernen.

Sollten Makrophagen aus HSV-infizierten Mäusen auf ihren Virusgehalt titriert werden, wurden die nach dem Waschen noch an der Petrischale adhärrierenden Peritonealexsudatzellen bei -70°C eingefroren. Zur Titration analog B.2.2 wurden die Makrophagen aufgetaut und mit einem Gummischaber von der Plastikoberfläche abgekratzt.

Der Nachweis von HSV-Antigen in den Makrophagen erfolgte indirekt durch die Messung der Antikörperantwort der Maus nach Injektion einer Makrophagenpräparation aus HSV-infizierten Mäusen, die entsprechend dem im vorangehenden Absatz beschriebenen Vorgehen hergestellt war.

3.6 Organpräparation und -titration

Vorgehen zur Präparation von intraperitoneal gelegenen Organen zunächst analog Abschnitt B.3.5. Nach Durchtrennung der Bauchmuskelschicht konnte die Bauchhöhle eingesehen werden. Die Leber wurde von ihrer Verwachsungsfläche mit dem Zwerchfell gelöst und dann am Hilus von den Verbindungen zum Magen und Duodenum getrennt. Die Milz wurde am Hilus abgetrennt und von evtl. noch anhängendem Fettgewebe gereinigt. Lymphknoten wurden auf der Darmwand oder (nach i.p. Gabe von Kohlepulver, Norit A, Serva, Heidelberg, 14 Tage zuvor schwärzlich getönt) im Mesenterium aufgesucht und präpariert. Zur Präparation des Thymus wurde nach Desinfektion mit 70 %igem Alkohol das Fell über dem Thorax abgelöst. Nach Längsspaltung des Sternums und Abtrennung des Zwerchfells von den Rippen konnte der Thoraxinhalt eingesehen werden. Der Thymus wurde über dem Herz von der Trachea abgehoben.

Zur Titration wurden ca. 100 µg Gewebe in 900 µl Lahn-Medium aufgenommen und in einem Zentrifugenglas mit 10 Impulsen eines Branson-Sonifiers beschallt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1500 g wurde mit dem virushaltigen Überstand analog Abschnitt B.2.2 verfahren.

3.7 Kastration / Ovariectomie

Die Mäuse wurden nach Prämedikation mit Atropin (250 µg/g KG) (Atropinsulfat 0,0005®, Pharma Hameln Kerstein GmbH, Hameln/Westf.) mit Pentobarbital-Na (Nembutal®, Ceva, Neuilly-sur-Seine, Frankreich; 1,2 mg/g KG) narkotisiert. Bei den Weibchen wurde nach Rasur und sorgfältiger Desinfektion mit PVP-Jod (Betaisodona®, Mundipharma, Limburg) die Haut in der Flanke mit einem ca. 1 cm langen Schnitt durchtrennt. Die Haut wurde ringsum von der Bauchmuskulatur mobilisiert. Dann wurde mit gleichem Schnittverlauf die Bauchmuskulatur durchtrennt. Nachdem evtl. die Sicht versperrende Darmschlingen zur Seite geschoben waren, wurde das Ovar mit dem daranhängenden Uterushorn herausgezogen. An der Ansatzstelle wurde eine Moskitoklemme gesetzt, und das Ovar wurde abgetrennt. Eventuell auftretende Blutungen wurden mit einem heißen Glasstab durch Koagulation gestillt. Die Wunde wurde mit Rückstichnähten mit Ethilon 4-0, PS-2 (Ethilon GmbH, Norderstedt) verschlossen. Das Vorgehen kontralateral war analog. Bei "mock"-operierten Tieren wurde nur die Bauchhöhle geöffnet und durch eine Naht wieder verschlossen. Bei den Männchen wurde nach Desinfektion das Scrotum durch einen medianen Längsschnitt eröffnet. Die Hoden nebst Hüllen mußten u.U. erst von ventro-kranial-medial aus dem Leistenkanal herausluxiert werden. Der Samenstrang wurde mit einer Moskitoklemme abgeklemmt, dann wurde der Hoden distal der Klemme abgesetzt. Blutungen wurden wie oben versorgt. Für den zweiten Hoden war das Vorgehen analog. Das Scrotum wurde durch Einzelknopfnähte verschlossen. Nach dem Eingriff wurden die Mäuse einzeln in Käfigen gehalten. Sie zogen sich die Fäden

nach wenigen Tagen selbst. Etwa 2 Wochen nach dem Eingriff konnten sie wieder in Gruppen zusammengesetzt werden. Vier Wochen nach dem Eingriff wurden sie für die Versuche eingesetzt.

4. Bestimmung der Antikörperspiegel

Die Wahl des Bestimmungsverfahrens für die Antikörper fiel auf den Neutralisationstest, dessen Vorteil darin zu sehen ist, daß er die Messung der infektiösimmunologisch relevanten Antikörper ermöglicht, die gegen Epitope auf der Virus-hülle gerichtet sind.

4.1 Neutralisierende Antikörper gegen HSV

4.1.1 Durchführung des Neutralisationstests

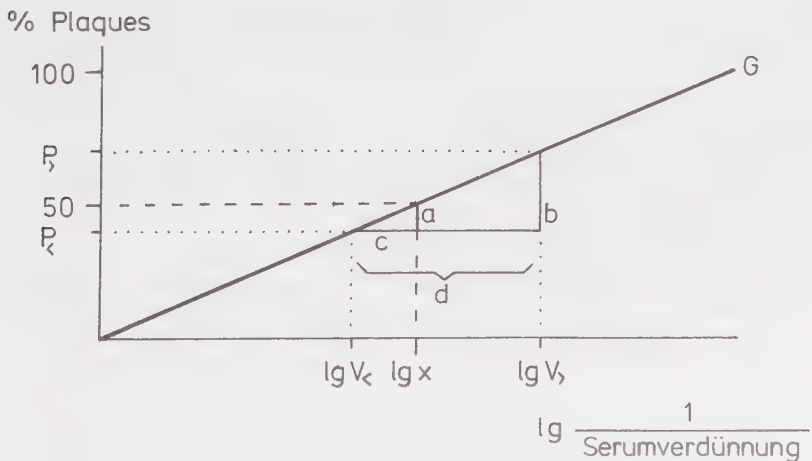
Zunächst wurde in Volumina von 0,5 ml mit Lahn-Medium eine Verdünnungsreihe des zu testenden Serums in Zweifachschritten beginnend mit 1:5 oder 1:10 hergestellt. Dann wurde eine Suspension von HSV-1-Virionen angesetzt. Die bei -70°C eingefrorene Virus-Zell-Suspension wurde zunächst analog Abschnitt B.2 aufbereitet und dann so verdünnt, daß die Endkonzentration 20-30 PFU HSV-1 in 0,2 ml betrug. 0,5 ml der Virusverdünnung wurden mit 0,5 ml der Serumverdünnung gemischt, und der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden von diesem Ansatz als Doppelbestimmung je 0,2 ml Serum pro Verdünnungsstufe auf Rollrandröhrchen mit KaN- oder Vero-Zellen pipettiert. Als Viruskontrolle wurden 0,2 ml der Virusendverdünnung 1:2 mit Lahn-Medium verdünnt und ebenfalls auf Rollrandröhrchen gegeben. Nicht neutralisiertes Virus adsorbierte nun an Zellen des Monolayers im RR. Nach 2-3 h wurden 0,2 ml eines Anti-HSV-Antikörper-haltigen verdünnten Humanserums hinzugegeben, welches verhinderte, daß aus den infizierten Zel-

len freigesetztes Virus in das Medium gelangte und neue Zellen infizierte. Dem Virus blieb die Ausbreitung von Zelle zu Zelle ohne Passieren des Extrazellularraums. So entstanden um eine durch ein Virus infizierte Zelle Plaques oder Riesenzellen, die nach zweitägiger Inkubation bei 37°C ausgezählt werden konnten.

4.1.2 Berechnung des Antikörper-Titers

Durch den Vergleich der Plaque-Zahlen (Mittelwerte) in den einzelnen Serumverdünnungen mit der Viruskontrolle wurde der Prozentsatz des nicht neutralisierten Virus errechnet. Als Titer wurde nach Reed und Münch (192) diejenige Serumverdünnung durch Interpolation bestimmt, bei der gerade 50 % der eingesetzten Virionen neutralisiert wurden.

Trägt man den Logarithmus des Kehrwertes der Serumverdünnung (V) (Abszisse) gegen den Prozentsatz an nicht-neutralisiertem Virus (Ordinate) auf, so ergibt sich im Idealfall eine Gerade (G). Graphisch läßt sich dann die dem Wert von 50 % neutralisierten Virionen zugehörige Serumverdünnung (x) ermitteln.



Rechnerisch gilt nach dem 2. Strahlensatz

$$a : b = c : d$$

$$\begin{aligned} \text{mit } a &= 50 \% - P_{<} ; \\ b &= P_{>} - P_{<} ; \\ c &= \lg x - \lg V_{<} ; \\ d &= \lg V_{>} - \lg V_{<} ; \end{aligned}$$

folgt also

$$(50 \% - P_{<}) : (P_{>} - P_{<}) = (\lg x - \lg V_{<}) : (\lg V_{>} - \lg V_{<}).$$

Folglich ist

$$\lg x = \frac{50 \% - P_{<}}{P_{>} - P_{<}} \cdot (\lg V_{>} - \lg V_{<}) + \lg V_{<}$$

und mit $(\lg V_{>} - \lg V_{<}) = \lg$ Verdünnungsfaktor (z.B. 2 für 2fache Verdünnungsschritte) ist

$$\lg x = \lg V_{<} + \frac{50 \% - P_{<}}{P_{>} - P_{<}} \cdot \lg \text{Vf.}$$

Nach Potenzierung ergibt sich

$$x = 10^{\left[\lg V_{<} + \frac{50 \% - P_{<}}{P_{>} - P_{<}} \cdot \lg \text{Vf} \right]}$$

als die Serumverdünnung (x-fach), bei der gerade 50 % der eingesetzten Virionen neutralisiert werden. (1:x) ist der gesuchte 50 %-Endpunkt-Titer.

Von den Titerwerten x_i einer Gruppe gleichartig behandelter Mäuse (5 Tiere pro Gruppe) wurde der arithmetische Mittelwert gebildet, und die Standardabweichung wurde errechnet.

Im Ergebnisteil werden die reziproken Werte $\bar{x}$ der Mittelwerte der Titer ($1:\bar{x}$) angegeben.

4.2 Hämolysierende Antikörper gegen Schafserythrozyten (SRBC)

4.2.1 Hämolysin-Test (79)

Der Hämolysin-Test diente zum Nachweis von komplementbindenden hämolysierenden Antikörpern in den Seren von Mäusen, die mit Schafserythrozyten immunisiert worden waren.

4.2.1.1 Veronal-Puffer (VP)

Der VP setzte sich folgendermaßen zusammen: 5 mM Natriumbarbital, 142 mM NaCl, 3,55 mM CaCl_2 , 50 mM $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,55 mM HCl, Aqua dest. ad 1000 ml, pH 7,4, 1 g/l Gelatine (Serva, Heidelberg).

4.2.1.2 Schafserythrozyten (SRBC)

Handelsübliche Schafserythrozyten in Alseverlösung (Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH, Lich) wurden dreimal in einem 8fachen Volumen an VP gewaschen, dann mit VP auf eine Konzentration von ca. 5 % (V_{aktuell}) gebracht und durch eine lockere Wattelage filtriert, um Aggregate zu entfernen. Lysierte man eine Probe dieses Ansatzes durch Verdünnung mit dem 14fachen Volumen einer 0,1 % Natriumbicarbonatlösung, so ergab sich bei richtiger Konzentration der SRBC eine $\text{OD}_{540 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ von 0,7(04).

Eine Korrektur auf das Endvolumen V_g mit VP erfolgte nach der Formel

$$V_g = V_{\text{aktuell}} \cdot \frac{OD_{\text{aktuell}}}{0,7(04)} \cdot$$

4.2.1.3 Komplement

Dreifach SRBC-adsorbiertes Meerschweinchenserum diente in einer Verdünnung von 1:15 (mit VP) als Komplementquelle.

4.2.1.4 Praktische Durchführung

Von den zu testenden Seren wurde eine Verdünnungsreihe in Zweifachschritten mit VP, beginnend mit 1:5, hergestellt. Pro Verdünnung wurden 250 μ l benötigt.

Ansätze (μ l)	Testserum	Negativkontrolle	50 %-Lyse Kontrolle	100 %-Lyse Kontrolle
Puffer	Ø	250	Ø	Ø
Serumverdünnung	250	Ø	Ø	Ø
SRBC 5 %	250	250	125	250
Komplement	125	125	Ø	Ø
Citrat-NaCl (0°C)	1250	1250	Ø	Ø
Na ₂ CO ₃ (0,1 %)	Ø	Ø	1750	1625

Der Puffer bzw. die jeweilige Serumverdünnung wurden gut mit den SRBC gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe des Komplement erfolgte eine erneute Inkubation bei 37°C für exakt 15 min. Danach wurde die Lyse-Reaktion durch Zumischen von eiskalter Citrat-NaCl-Lösung (15 mN Natriumcitrat, 120 mM NaCl, Aqua dest. ad 1000 ml) abgestoppt. Die Lyse der Kontroll-SRBC erfolgte durch 0,1 % Na₂CO₃. Nach dem Pelletieren der nicht lysierten SRBC erfolgte die Messung des freigesetzten Hämoglobin photometrisch bei 540 nm.

4.2.2 Berechnung des Hämolysin-Titers

Als Titer wurde der reziproke Wert der Serumverdünnung angegeben, die 50 % Lyse ergeben würde. Trägt man analog B.4.1.2 die Konzentration an freigesetztem Hämoglobin (in % Maximallyse) gegen den Logarithmus der Serumverdünnung auf, so ergibt sich eine fallende Gerade. Daraus resultiert als Formel zur Berechnung des AK-Titers x

$$x = 10^{\left[\lg V_{>} - \frac{50\% - P_{<}}{P_{>} - P_{<}} \cdot \lg V_f \right]}$$

Von den Titerwerten gleichartig behandelter Tiere wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

4.3 Statistische Auswertung

Zur Entscheidung, ob sich die Titerwerte zweier verglichener Mäusegruppen signifikant unterscheiden, wurde der Student-t-Test herangezogen. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ gewählt.

5. Der Nachweis von Interferon (117,179)

Der Nachweis der biologischen Aktivität von Interferon in Mäuseseren oder in Kulturüberständen von Peritonealmakrophagen erfolgte durch die Prüfung der jeweiligen Probe im Hinblick auf ihre Fähigkeit, die Virusvermehrung in Fibroblastenkulturen zu hemmen.

Monolayer zwei Tage alter sekundärer Mäuseembryofibroblasten in 24-well-Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden 16 Stunden lang mit der jeweiligen Probe in verschiedenen Verdünnungsstufen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Hanks' Lösung wurden die Platten mit Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Stamm Indiana, mit 1000 PFU/Well infiziert. Einen und zwei Tage später wurden die Zellkulturen auf das Auftreten zytopathischer Effekte hin begutachtet. Die Titer wurden angegeben als höchste Verdünnung der jeweiligen Probe, welche die Ausbildung von zytopathischen Effekten verhinderte.

6. Wirkstoffe

Wirkstoff	Bezugsquelle	Anmerkungen
1. Bestatin	H. Umezawa, Tokio, Japan; W.E.G. Müller, Inst. f. Physiol. Chemie, Universität Mainz	T-Zell-Stimulator
2. Corynebact. parvum	Coparvax® Wellcome, Burgwedel	Immunmodulator; 7 mg/ml (abgetötete Bakterien)
3. Cyclophosphamid	ASTA, Bielefeld	Immunsuppressivum
4. Cyclosporin A	H. Borel, Sandoz, Basel	Immunsuppressivum; beeinflusst verschiedene Vorgänge bei der Akti- vierung von T-Lympho- zyten
5. Cyproteron	Schering AG, Berlin	Antiandrogen
6. Cyproteron- acetat	Schering AG, Berlin	Antiandrogen + Progestagen
7. Dextransulfat 500 000	Serva, Heidelberg	polyklonaler B-Zell- Aktivator, blockiert Phago- zytosefunktion der Makro- phagen; hemmt HSV-Adsorption
8. Freundsches Adjuvans	Difco, Detroit, Mich., USA	
9. Indomethacin	Sigma, München	Cyclooxygenaseinhibitor
10. Poly-I:C(LC)	H.B. Levy Bethesda, MD, USA	Lot (138-1) Poly-I:C 2 mg/ml, Poly-L-Lysin 1,5 mg/ml, Carboxymethyl- cellulose 0,5 %
11. Silica (amorph)	Sigma, München	Partikelgröße 0,5-10 µm, zerstört Makrophagen
12. Thioglycollat	Difco, Detroit, Mich., USA	Makrophagenstimulator

Die Substanzen 1, 3 und 7 wurden in Hanks' Medium gelöst; 10 wurde mit Hanks' Medium verdünnt, 9 wurde in einem kleinen Volumen NaOH (1 n) gelöst, auf das gewünschte Endvolumen verdünnt mit Aqua bidest. und auf einen pH von etwa 8 gebracht. Die Substanz 4 wurde in Äthanol-Tween 80 gelöst und vor der Injektion mit Aqua bidest. weiter verdünnt; die Substanzen 5 und 6 wurden in 0,5 % Triton WR 1339 (Serva, Heidelberg) in PBS unter Ultrabeschallung suspendiert. Die Substanz 11 wurde in Hanks' Medium suspendiert.

C. Ergebnisse

1. Allgemeine Aspekte der Bildung neutralisierender Antikörper in mit HSV-1 primär infizierten Mäusen

Eingangs werden einige Versuche beschrieben, die der Charakterisierung des Systems "neutralisierende Antikörper in der mit HSV-1 primär infizierten Maus" dienen sollen: Die Entwicklung der AK-Titer in Abhängigkeit von der Zeit und der Einfluß der Virusdosis, des Inokulationsortes und des Virusstammes auf die Höhe der resultierenden AK-Spiegel.

1.1 Der zeitliche Verlauf der Antikörperspiegel nach einer primären i.p.-Infektion mit HSV-1

Zunächst sollte festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt neutralisierende Antikörper in den Seren HSV-1-infizierter Mäuse auftraten.

Eine Gruppe von weiblichen NMRI-Mäusen wurden hierzu intraperitoneal (i.p.) mit einer subletalen Dosis von 3×10^3 PFU HSV-1 infiziert. Über eine Spanne von 30 Tagen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion je 4 Tiere entblutet. Die Seren wurden bis zum Ende der Sammelperiode bei -20°C aufbewahrt und dann zusammen im NT untersucht.

Wie die Abb. 1 zeigt, war der früheste Zeitpunkt, an dem sich neutralisierende Antikörper nachweisen ließen, der 5. Tag nach Infektion. Bis zum 11. Tag nach der Infektion konnte nur ein geringer Anstieg der Antikörperspiegel gemessen werden, danach stiegen die Antikörper rascher an, um am 21. Tag ein Plateau zu erreichen. In den meisten weiteren Versuchen wurden deshalb die Mäuse 21 Tage nach der Infektion entblutet.

Bei männlichen NMRI-Mäusen war nach dem 21. Tag i.p. ebenfalls kein signifikanter Titeranstieg mehr zu verzeichnen, jedoch lagen die Titer insgesamt niedriger als bei den Weibchen.

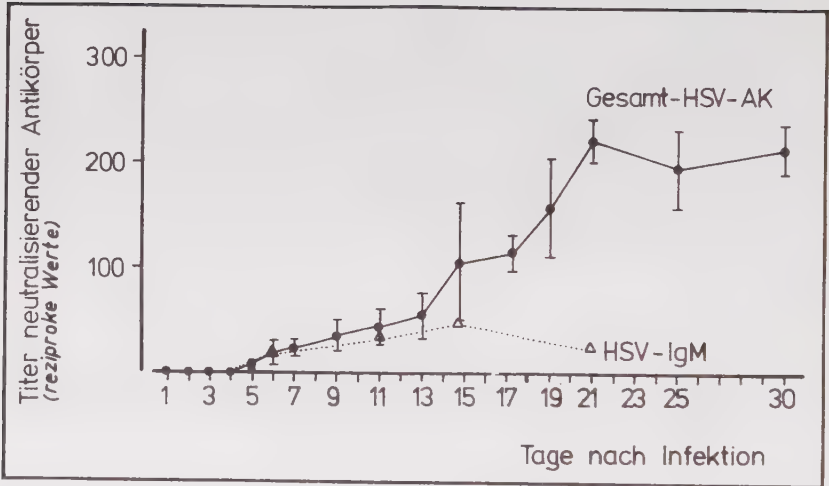


Abb. 1: Der zeitliche Verlauf der Antikörperspiegel nach primärer i.p.-Infektion mit HSV-1.

Eine Gruppe von weiblichen NMRI-Mäusen wurde i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Je 4 Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entblutet. Die Seren wurden im Neutralisationstest auf den Gehalt an Anti-HSV-Antikörpern getestet.

(●—●: unbehandeltes Serum; Δ Δ : IgM-haltige Fraktion nach DEAE-Sephacel-Säule)

(In den Abbildungen und Tabellen werden jeweils die reziproken Werte der Antikörpertiter angegeben.)

Der Verlauf der Kurve der AK-Titer in Abhängigkeit von der Zeit war bei weiblichen B10.A(5R)-Mäusen analog der für die NMRI-Weibchen ermittelten.

Bei einer Infektionsdosis von 10^5 PFU konnten schon 4 Tage p.i. Antikörper nachgewiesen werden. Insgesamt stiegen die Spiegel hier auch schneller an.

Nach der Abtrennung des IgM von den nach Tagen gruppenweise gepoolten Seren über DEAE-Sephacel-Minisäulen wurde in der IgM-Fraktion die neutralisierende Aktivität gemessen. Bis zum 9. Tag p.i. unterschied sich der Kurvenverlauf nicht von dem der Gesamt-AK. Danach verlief die IgM-Kurve jedoch flacher, erreichte am 15. Tag ein Maximum und war bis zum 21. Tag p.i. bereits wieder abgesunken.

1.2 Der Einfluß der Virusdosis auf die Höhe der Antikörper- spiegel

Im nächsten Versuch wurde untersucht, wie sich subletale ($<10^5$ PFU HSV-1, Stamm Lennette) und fakultativ letale ($>10^5$ PFU) Infektionen auf das Ausmaß der Antikörper-Antwort auswirken.

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden deshalb gruppenweise mit Dosen von 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 bzw. 10^6 PFU HSV-1 i.p. infiziert und 21 Tage nach der Infektion entblutet.

Im niedrigen Dosisbereich (Abb. 2) von 10^2 PFU lagen bei Weibchen und Männchen die AK-Titer niedrig. Eine Steigerung der Dosis führte bis 10^4 PFU bei den Weibchen zu einem starken, bei den Männchen nur zu einem schwachen Titeranstieg. Nach der Erhöhung der Dosis auf 10^5 PFU kam es bei den Weibchen nur noch zu einem geringen, bei den Männchen hingegen zu einem deutlichen Anstieg der AK-Spiegel. Insgesamt lagen in allen Dosisbereichen die AK-Titer bei den Weibchen deutlich höher als bei den Männchen. Nach der Infektion mit 10^5 PFU starben einige Tiere; weniger Männchen als Weibchen.

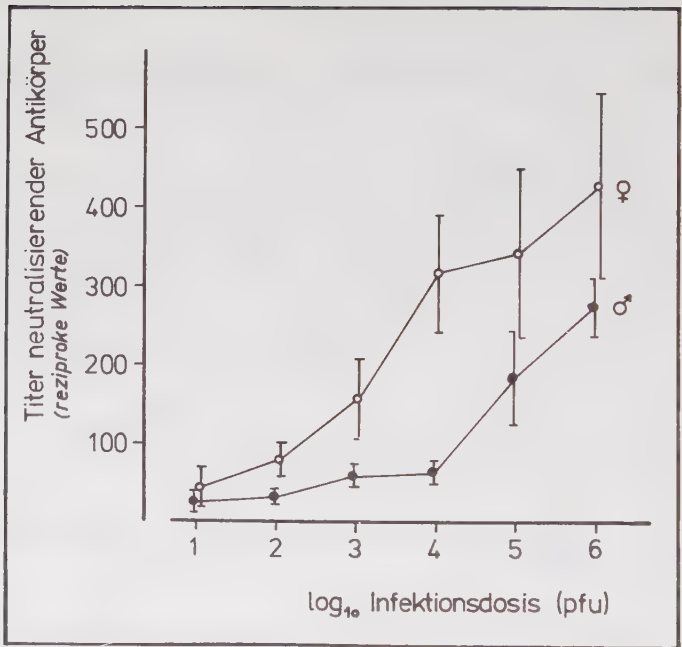


Abb. 2: Der Einfluß der Virusdosis auf die Höhe der HSV-Antikörperspiegel.

Gruppen weiblicher und männlicher NMRI-Mäuse wurden mit 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 bzw. 10^6 PFU HSV-1 (Len) i.p. infiziert. Die Tiere wurden 21 Tage nach der Infektion entblutet.

In den Gruppen der mit 10^5 PFU infizierten Tiere starben je 20 % der Mäuse; bei den mit 10^6 PFU infizierten Weibchen starben 40 % der Tiere. Die Todesfälle wurden zwischen dem 6. und dem 15. Tag p.i. registriert.

Die Unterschiede zwischen den AK-Titern der weiblichen und der männlichen Mäuse waren außer bei den mit 10^1 PFU infizierten Tieren statistisch signifikant (Student-t-Test, $p < 0,05$). Bei den weiblichen Mäusen wurden signifikante Titerdifferenzen ermittelt beim Vergleich von $10^1/10^2$, $10^2/10^3$ und $10^3/10^4$ PFU, bei den männlichen Tieren bei $10^2/10^3$, $10^4/10^5$ und $10^5/10^6$ PFU.

1.3 Der Einfluß des Inokulationsortes auf das Ausmaß der AK-Antwort

Es sollte nun geprüft werden, ob die Höhe der AK-Titer von den lokalen Besonderheiten der Eintrittspforte des Virus abhängt.

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden an jeweils unterschiedlichen Inokulationsorten entweder mit 3×10^3 PFU HSV-1 (infektiöses Virus) oder mit 300 µg einer durch Formalin inaktivierten HSV-1-Vakzine immunisiert und 21 Tage später entblutet. Die Verabfolgung des inaktivierten Virus sollte dazu dienen, den Einfluß der lokalen Vermehrung (beim infektiösen Virus) auf die Höhe der AK-Spiegel abschätzen zu können.

Bei den mit HSV-1 infizierten Mäusen lagen die AK-Spiegel am höchsten nach der i.p.-Infektion, niedriger bei der Infektion in die Fußsohle und am niedrigsten nach der subcutanen Infektion. Nur nach der i.p.-Infektion hatten die Weibchen signifikant höhere AK-Titer als die Männchen. Die höchsten AK-Pegel nach der Immunisierung mit der inaktivierten HSV-1-Vakzine zeigten diejenigen Tiere, denen die Dosis in die Pfote verabreicht worden war. Etwas niedrigere Titer waren nach der i.p.-Applikation zu finden. Am niedrigsten lagen die AK-Spiegel bei den subcutan immunisierten Mäusen.

1.4 Der Vergleich verschiedener HSV-1-Stämme hinsichtlich der Humoralimmunogenität bei einer primären Infektion der Maus

Trotz ihrer serologischen Verwandtschaft weisen verschiedene Stämme von HSV-1 starke Unterschiede hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und ihrer Pathogenität in der Maus auf. Gruppen von weiblichen NMRI-Mäusen wurden deshalb mit 10^2 bzw. 3×10^3 PFU jeweils verschiedener HSV-1-Stämme infiziert um festzustellen, ob diese Stämme auch eine unterschiedlich starke AK-Antwort induzieren.

Tabelle 1: Der Einfluß des Inokulationsortes auf die Höhe der Antikörper-Spiegel nach primärer HSV-1-Infektion

Inokulationsort	Geschlecht	Titer neutralisierender Antikörper (r.W.)	
		infektiöses HSV-1	inaktivierte HSV-1-Vakzine
subcutan (s.c.)	♀	$21 \pm 12^{a,b}$	$14 \pm 8^{a,b}$
	♂	$11 \pm 5^{a,b}$	$15 \pm 10^{a,b}$
intra-plantar (i.plant.)	♀	130 ± 23^c	69 ± 13^d
	♂	112 ± 15	44 ± 18
intra-peritoneal (i.p.)	♀	301 ± 65^d	50 ± 12^c
	♂	124 ± 28	43 ± 10

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) in 0,2 ml (i.p. und s.c.) Lahn-Medium bzw. 0,1 ml (i.plant.) Lahn-Medium infiziert. Die Tiere wurden drei Wochen nach der Infektion entblutet.

Signifikante AK-Titerunterschiede (Student-t-Test, $p < 0,05$) ♀/♂: d; s.c./i.p.: a; s.c./i.plant.: b; i.p./i.plant.: c; (r.W.: reziproke Werte)

Bei den wenig pathogenen Stämmen Len, IES, HFEM und ANG (Abb. 3) resultierte aus der Infektion mit einer höheren Virusdosis auch eine deutliche Steigerung der AK-Spiegel. Die sehr pathogenen Stämme WAL und ANG path zeigten bei erhöhter Dosis etwas niedrigere AK-Titer. So ergaben sich bei den untersuchten HSV-1-Stämmen bezüglich der AK-Spiegel, die sie induzieren, die Rangfolgen:

$$\begin{array}{l} 10^2 \text{ PFU: } \text{Len} = \text{ANG} = \text{HFEM} < \text{IES} < \text{WAL} = \text{ANGpath} \\ 3 \times 10^3 \text{ PFU: } \text{HFEM} < \text{WAL} < \text{Len} = \text{IES} \\ \text{WAL} = \text{ANG} = \text{ANGpath} = \text{Len} \end{array}$$

1.5 Die Antikörperspiegel in inaktivierten Seren

Die Wirksamkeit von Seren hinsichtlich der Virusneutralisation ist laut Literatur in unterschiedlichem Maß von der Anwesenheit von Komplement abhängig (75,253,254).

Wurden Seren HSV-infizierter Mäuse 30 Minuten bei 56°C inaktiviert, so ergab sich ein Aktivitätsverlust bei den neutralisierenden AK von maximal 6 %:

aktiv 219 ± 37 , inaktiviert 207 ± 39 bzw.

aktiv 499 ± 64 , inaktiviert 475 ± 124 .

Es konnte somit festgestellt werden, daß nach einer primären Infektion mit dem HSV-1 (Len) neutralisierende Antikörper 5 Tage p.i. auftraten. Nach einem stetigen Anstieg bis zum 21. Tag p.i. blieben die Titerwerte danach stabil. Die Höhe der AK-Spiegel 21 Tage nach Infektion war abhängig von der Höhe des Virusinokulums und vom Inokulationsort. Weibliche Mäuse zeigten unabhängig von den vorgenannten Faktoren stets höhere AK-Titer als männliche Mäuse; nach i.p.-Infektion war die Differenz am deutlichsten ausgeprägt. Weiterhin war ein Einfluß der Pathogenität des zur Infektion verwendeten Virusstammes zu erkennen. Die Verminderung der neutralisierenden Aktivität der Seren nach der Inaktivierung hitzelabiler Komplementkomponenten war vernachlässigbar.

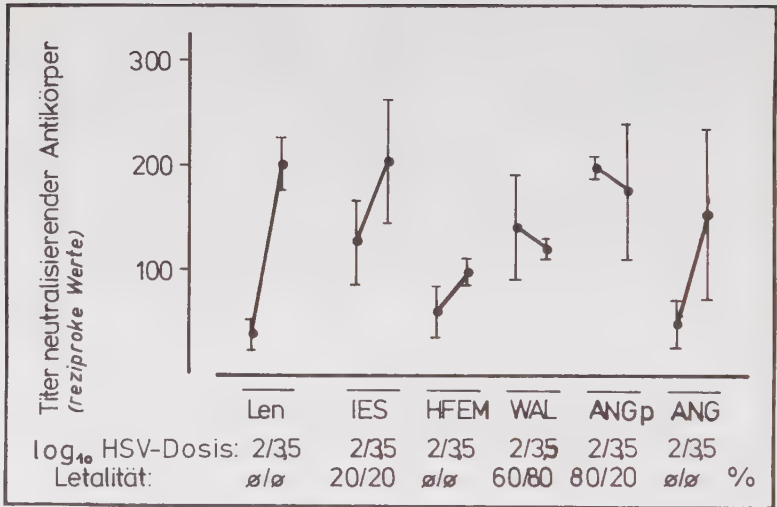


Abb. 3: Der Vergleich verschiedener HSV-1 Virusstämme hinsichtlich der von ihnen induzierten primären Antikörper-Antwort.

Gruppen weiblicher NMRI-Mäuse wurden mit 10^2 ($\log_{10}$ HSV-Dosis = 2) bzw. 3×10^3 ($\log_{10}$ HSV-Dosis = 3,5) PFU HSV-1 der Stämme Len, IES, WAL, ANG und ANGpath i.p. infiziert. 21 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse entblutet.

In mehreren Versuchsgruppen starben eine Reihe von Mäusen. Diese Todesfälle wurden zwischen dem 6. und dem 17. Tag p.i. registriert. Es werden % Letalität in Abhängigkeit von der HSV-Dosis (10^2 bzw. $10^{3,5}$ PFU) angegeben.

Bei den Stämmen Len, IES, HFEM und ANG war die Differenz der AK-Titer $10^2/3 \times 10^3$ PFU statistisch signifikant (Student-t-Test, $p < 0,05$).

2. Der Einfluß verschiedener physiologischer Faktoren auf die HSV-Antikörper

Die nächsten Versuche sollten die Wirkung verschiedener genetisch bedingter Größen auf das Ausmaß der AK-Antwort HSV-infizierter Mäuse untersuchen. Hierzu wurde geprüft, wie sich die AK-Spiegel in Abhängigkeit von bestimmten Transplantationsantigenen der Maus verhielten und welche Einflüsse geschlechtsbedingte hormonelle Faktoren ausübten.

2.1 Der Einfluß des H-2-Haplotyps und des Background-Genoms auf die Antikörper-Spiegel

Bei Immunreaktionen unterliegen die Interaktionen der beteiligten Zellen einer genetischen Kontrolle über die Expression von Histokompatibilitätsantigenen. Es sollte deshalb festgestellt werden, ob definierte genetische Konstellationen, wie sie in Inzucht-Mäusestämmen vorliegen, zu einer besonders starken oder schwachen AK-Antwort gegen HSV-1 führen. Hierzu wurden weibliche und männliche Mäuse von 16 Inzuchtstämmen mit 3×10^3 PFU HSV-1 i.p. infiziert und 21 Tage später entblutet. Zum Vergleich wurde der sonst meist verwendete Auszuchtstamm NMRI bezüglich der AK-Antwort mitgetestet.

Der Vergleich der Serumspiegel neutralisierender Antikörper (Tab. 2) ergab, daß eine Einordnung in gute oder schlechte Antikörperbildner weder nach einem bestimmten H-2-Haplotyp noch nach dem Background-Stamm möglich war. Die höchsten Serumspiegel wurden bei den Weibchen von C3H.SW, B10.HTT, BALB/c und A.TL produziert, während bei den Männchen B10.HTT, A.TL, AKR, BALB/c und DBA/2 an der Spitze lagen. Insgesamt konnten bei Weibchen und Männchen die gleichen Stämme in die Kategorien gute, weniger gute und schlechte Antikörperbildner eingeordnet werden. Ausnahmen bildeten jedoch die Stämme C3H.SW und DBA/2.

Bei allen Stämmen lagen die Serumspiegel der weiblichen Mäuse höher als die der Männchen.

Tabelle 2: Der Einfluß des H-2-Haplotyps und des Background-Genoms auf die Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen HSV-1.

Stamm	H-2-Haplotyp				Back-ground	HSV-Antikörper-titer (r.W.)		Kategorie	
	K	I-A	I-E	D		♀	♂	♀	♂
A.TL	s	k	k	d		210 ± 54*	68 ± 17	+++ / +++	
B10.A	k	k	k	d	B 10	183 ± 69*	52 ± 18	++ / ++	
B10.D2	d	d	d	d	B 10	145 ± 41*	50 ± 7	++ / ++	
B10.T(6R)	q	q	q	d	B 10	184 ± 85*	53 ± 29	+++ / ++	
B10.A(4R)	k	k	b	b	B 10	158 ± 83*	52 ± 24	++ / ++	
B10.HTT	s	s	k	d	B 10	225 ± 21*	81 ± 44	+++ / +++	
C3H.SW	b	b	b	b		235 ± 87*	26 ± 13	+++ / +	
C57BL/10	b	b	b	b	B 10	123 ± 40*	43 ± 21	++ / ++	
BALB/b	b	b	b	b		89 ± 29*	29 ± 19	+ / +	
C57BL/6	b	b	b	b	B 10	66 ± 21	33 ± 24	+ / +	
C3H	k	k	k	k		151 ± 32*	40 ± 23	++ / +	
CBA/C.a	k	k	k	k		147 ± 56*	37 ± 24	++ / ++	
AKR/Cum	k	k	k	k		173 ± 39*	55 ± 29	++ / +++	
B10.BR	k	k	k	k	B 10	116 ± 3*	46 ± 9	+ / ++	
BALB/c	d	d	d	d		220 ± 40*	54 ± 39	+++ / ++	
DBA/2	d	d	d	d		141 ± 35*	54 ± 17	++ / ++	
NMRI	(Auszucht)					320 ± 41*	76 ± 18		

Weibliche und männliche Tiere aller Stämme wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert und 21 Tage nach der Infektion entblutet.

Als Maßstab für die Einteilung in gute (+++), weniger gute (++) und schlechte (+) HSV-Antikörperbildner galt:

♀ > 200: (+++); 120 bis 200: (++); < 120: (+);

♂ > 55: (+++); 35 bis 55: (++); < 35: (+).

* : Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) ♀/♂.

2.2 Die Antikörper-Spiegel bei F₁-Mäusen aus (C57BL/6 x NMRI)

Die AK-Titer lagen, wie der vorangegangene Versuch zeigte, bei NMRI-Mäusen relativ hoch, bei C57BL/6-Mäusen relativ niedrig. Hieraus ergab sich die Frage, ob durch eine Kreuzung der beiden Stämme bestimmte, für die AK-Bildung bedeutsame genetische Charakteristika gefunden werden könnten.

Die Paarung einer weiblichen (weißen) NMRI- mit einer männlichen (schwarzen) C57BL/6-Maus ergab 11 Junge:

	braun	schwarz
♀	3	3
♂	3	2

Im Alter von 8 Wochen wurden die F₁-Tiere mit HSV-1 (Len) 3×10^3 PFU infiziert und 3 Wochen später entblutet (Tab. 3). Die männlichen Jungtiere mit schwarzem Fell hatten signifikant höhere AK-Spiegel als ihre braunen Geschwister, und die braunen Weibchen wiesen signifikant höhere Titer als die braunen Männchen auf. Beim analogen Vergleich der übrigen Gruppen wurden tendenzmäßig gleiche Verhältnisse gefunden.

Tabelle 3: Das Verhalten der Antikörper-Spiegel bei (C57BL/6 x NMRI) F₁-Mäusen

C57BL/6♂ x NMRI♀	Titer neutralisierender Antikörper (r.W.)	
	♀	♂
schwarzes Fell	320 ± 171	127 ± 26 ^a
braunes Fell	179 ± 46 ^b	64 ± 7

Im Alter von 6 Wochen wurden die Tiere des Wurfes 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. 21 Tage später wurden die Mäuse entblutet.
Signifikante AK-Titerunterschiede (Student-t-Test, $p < 0,05$)
b : ♀/♂ ; a : schwarz/braun
(r.W. = reziproke Werte)

2.3 Der Einfluß einer Ovariectomie bzw. einer Kastration auf die Höhe der HSV-Antikörper-Spiegel

Im nächsten Versuch sollte festgestellt werden, in welchem Ausmaß hormonelle Faktoren für die unterschiedlichen AK-Titer bei weiblichen und männlichen Mäusen eines Stammes verantwortlich waren. Hierzu wurden ovariectomierte bzw. kastrierte NMRI-Mäuse mit HSV-1 infiziert.

Es zeigte sich (Tab. 4), daß die Ovariectomie bei den weiblichen Mäusen zu einer Verminderung der AK-Spiegel im Vergleich zu den Kontrolltieren (nur Laparotomie) führte, während bei den Männchen die Kastration eine deutliche Steigerung der Titerwerte im Vergleich zu den Kontrolltieren (nur Scrototomie) bewirkte. Die Differenz der AK-Titer zwischen ovariectomierten und kastrierten Tieren war nicht mehr signifikant.

Tabelle 4: Die Antikörper-Spiegel nach einer Ovariectomie bzw. Kastration

Geschlecht	Titer neutralisierender Antikörper (r.W.)		
	Kontrollen (nicht operiert)	Kontrollen (mock-operiert)	Ovariectomie/ Kastration
♀	264 ± 54 *	372 ± 107 *	184 ± 39
♂	67 ± 14	47 ± 19	155 ± 65

Vier Wochen nach dem jeweiligen Eingriff wurden die NMRI-Mäuse i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. 21 Tage danach wurden sie entblutet.

* : Signifikanter Unterschied der Titer von Weibchen und Männchen

(Student-t-Test, $p < 0,05$).

2.4 Die Wirkung von antiandrogenen Substanzen auf die Antikörper-Bildung

Offenbar üben die in den Testes gebildeten Androgene einen suppressorischen Einfluß auf die Antikörper-Synthese aus. Deshalb war es interessant festzustellen, ob einerseits die physiologischen Androgenspiegel bei weiblichen Tieren auch eine Wirkung auf die Antikörper-Synthese haben und andererseits, ob die bei Männchen AK-suppressorisch wirkenden Androgene in ihrer Wirkung neutralisiert werden können. Hierzu wurden weibliche und männliche NMRI-Mäuse mit HSV-1 infiziert bzw. mit einer inaktivierten HSV-1-Vakzine immunisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit Cyproteron bzw. Cyproteronacetat (jeweils 1 mg i.m.) behandelt.

Aus der Tabelle 6 ist zu ersehen, daß bei den männlichen Mäusen die Behandlung mit Cyproteron zu jedem Zeitpunkt einen Anstieg der AK-Spiegel bewirkte, gleichgültig ob die Tiere infektiöses oder inaktiviertes Virus injiziert bekommen hatten. Die Behandlung weiblicher Mäuse mit Cyproteron sowie die Gabe von Cyproteronacetat bei Weibchen oder Männchen ließ keinen regelmäßigen Einfluß der Substanzen auf die Spiegel an neutralisierenden AK erkennen. Immerhin konnten die AK-Spiegel bei den Weibchen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion bzw. Immunisierung durch eine Verabreichung von Cyproteron angehoben werden.

Die vorangegangenen Versuche haben also gezeigt, daß weder bestimmte Transplantationsantigene noch Produkte des Background-Genoms einen klar definierbaren Einfluß auf das Ausmaß der AK-Bildung hatten. Gene, die für die Antikörperantwort bedeutsam sind, schienen mit Genen für die Fellfarbe gekoppelt zu sein. Sowohl durch eine Kastration als auch durch die Verabreichung von Anti-Androgenen konnte demonstriert werden, daß androgene Sexualhormone die Höhe der AK-Spiegel nach HSV-Infektionen negativ beeinflussten.

Tabelle 5: Die Beeinflussung der HSV-Antikörper-Spiegel durch Cyproteronacetat

Zeitpunkt der Verabreichung	Titer neutralisierender Antikörper (r.W.)	
	♀	♂
Ø = Kontrolle	269 ± 69 ^b	47 ± 9
Tag (-1)	132 ± 21 ^{a,b}	79 ± 28 ^a
Tag 1	261 ± 58 ^b	79 ± 52
Tag 3	121 ± 48 ^a	82 ± 29 ^a
Tag 5	142 ± 43 ^{a,b}	39 ± 16
Tag 10	253 ± 50 ^b	77 ± 32

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erhielten sie eine Dosis von 1 mg Cyproteronacetat (suspendiert in 0,5 % Triton WR 1339 in PBS) i.m. in den linken Oberschenkel injiziert. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) zur Kontrollgruppe: a;

signifikanter Unterschied ♀/♂: b.

Tabelle 6: Die Beeinflussung der HSV-Antikörper-Spiegel durch Cyproteron

HSV- Präparation	Zeitpunkt der Verabreichung von Cyproteron	Titer neutralisierender HSV-Antikörper (r.W.)	
		♀	♂
HSV-1 (Len) (infektiös)	Ø = Kontrolle	225 ± 52 ^b	44 ± 16
	Tag 1	269 ± 57 ^b	108 ± 14 ^a
	Tag 5	435 ± 128 ^{b,a}	94 ± 56 ^a
inaktivierte HSV-1 Vakzine	Ø = Kontrolle	66 ± 22 ^b	18 ± 6
	Tag 1	99 ± 29 ^a	75 ± 38 ^a
	Tag 3	106 ± 38 ^{b,a}	68 ± 13 ^a
	Tag 5	77 ± 53	101 ± 59 ^a
	Tag 10	59 ± 26	67 ± 33 ^a

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) i.p. infiziert oder mit einer inaktivierten HSV-1 Vakzine (300 µg) immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erhielten sie eine Dosis von 1 mg Cyproteron i.m. in den linken Oberschenkel injiziert. 21 Tage nach der Infektion bzw. der Immunisierung wurden die Tiere entblutet.

Signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) zur Kontrollgruppe: a;

signifikanter Unterschied ♀/♂: b.

3. Die Bedeutung der Makrophagen für die HSV-Antikörper-
Antwort

3.1 Die Antikörper-Spiegel bei Silikat-behandelten Mäusen

Makrophagen spielen für die Initiierung und die Regulation von Immunantworten eine wichtige Rolle. Es sollte deshalb zunächst untersucht werden, wie sich die HSV-Antikörper-Spiegel nach einer Ausschaltung der Makrophagen am Inokulationsort verhalten. Durch die Einwirkung von Silikat (Quarzstaub) können Makrophagen selektiv zerstört werden (2).

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 i.p. und i.plant. infiziert. Ein Teil jeweils war 4 h vor der Infektion mit 30 mg Silikat intraperitoneal vorbe-handelt worden.

Die i.p.-Silikatbehandlung (Tab. 7) bewirkte eine Steigerung der AK-Spiegel bei weiblichen und männlichen Tieren sowohl nach einer i.p.- als auch nach einer i.plant.-Infektion. Ein analoger Versuch mit C57BL/6-Mäusen ergab ein gleichartiges Resultat.

Um zu sehen, über welchen Zeitraum sich die Wirksamkeit von Silikat erstreckte, wurden weibliche NMRI-Mäuse mit HSV-1 infiziert und gruppenweise zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Infektion mit Silikat behandelt. Abbildung 4 zeigt, daß die Verabfolgung von Silikat über einen großen Zeitraum von mindestens 4 Tagen a.i. bis zu 12 Tagen p.i. die AK-Titer steigern konnte.

Tabelle 7: Die Wirkung von Silikat auf die Höhe der HSV-Antikörper-Titer

Inokulationsort	Titer neutralisierender Antikörper (r.W.)			
	Kontrollen		Silikat-Behandlung	
	♀	♂	♀	♂
intra-peritoneal	237 ± 56 ^b	55 ± 21	399 ± 77 ^a	386 ± 119 ^a
intra-plantar	44 ± 16	57 ± 13	197 ± 77 ^a	196 ± 80 ^a

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Ein Teil der Tiere war vier Stunden vor der Infektion mit 30 mg Silikat i.p. vorbehandelt worden. Die Kontrolltiere erhielten Hanks' Lösung ohne Silikat. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) der AK-Titer von ♀/♂: b; Kontrolle/Silikat: a.

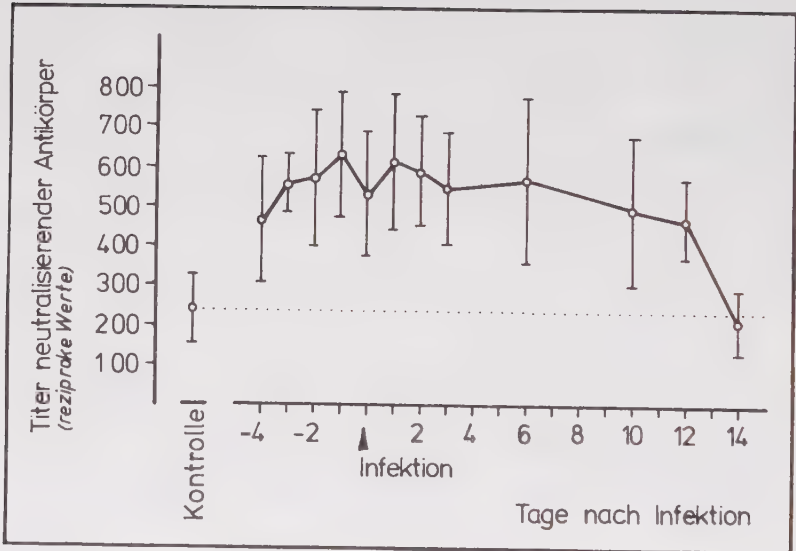


Abb. 4: Die zeitliche Abhängigkeit der Wirksamkeit von Silikat bezüglich einer Steigerung der HSV-Antikörperspiegel.

Weibliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erhielten sie eine Dosis von 30 mg Silikat in 0,5 ml Hanks-Lösung i.p. injiziert. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Für die Tage -4 bis 12 p.i. war der Titer-Unterschied Kontrolle/Silikat statistisch signifikant (Student-t-Test, $p < 0,05$).

3.2 Der Einfluß von Silikat auf die HSV-Vermehrung in verschiedenen Geweben

Nach Angaben in der Literatur (21) ermöglicht die Vorbehandlung von Mäusen mit Silikat eine stärkere Virusreplikation in der Maus. Es mußte deshalb zur Deutung unserer Ergebnisse die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die gestiegenen AK-Spiegel die Folge eines größeren Angebots an viralem Antigen an das Immunsystem waren. Um zu prüfen, ob dies für unser Modell einer Infektion mit subletaler Dosis auch zutraf, wurden weibliche NMRI-Mäuse mit 10^3 PFU HSV-1 infiziert. Ein Teil der Tiere erhielt 4 h vor der Infektion, ein Teil 9 Tage nach der Infektion 30 mg Silikat i.p. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Peritonealmakrophagen gewonnen. Gleichzeitig wurden die Mesenteriallymphknoten (14 Tage nach i.p.-Vormarkierung mit Norit-A), die Leber und die Milz präpariert. Der Virusgehalt der einzelnen Präparate wurde durch Titration ermittelt.

Relativ früh nach der Infektion (2 h und 5 h) konnte das Virus bei Kontrolltieren (keine Silikatbehandlung) nur in den Peritonealmakrophagen und in den Mesenteriallymphknoten nachgewiesen werden (Abb. 5). Bei Silikat-behandelten Tieren war hier zu diesen Zeitpunkten noch kein Virus nachweisbar. Hingegen fand sich bei diesen 5 h p.i. bereits Virus in der Milz. Am ersten Tag nach der Infektion fand sich in allen Präparaten Silikat-behandelter und nicht-behandelter Tiere Virus. Nach dem 3. Tag p.i. gelang kein Virusnachweis mehr. Bei Tieren, die 9 Tage nach Infektion Silikat i.p. erhielten, war weder am 10. noch am 11. Tag Virus nachweisbar (ohne Abb.). Die Virustiter in den Organen Silikat-behandelter Tiere lagen tatsächlich höher als bei den nicht-behandelten Mäusen.

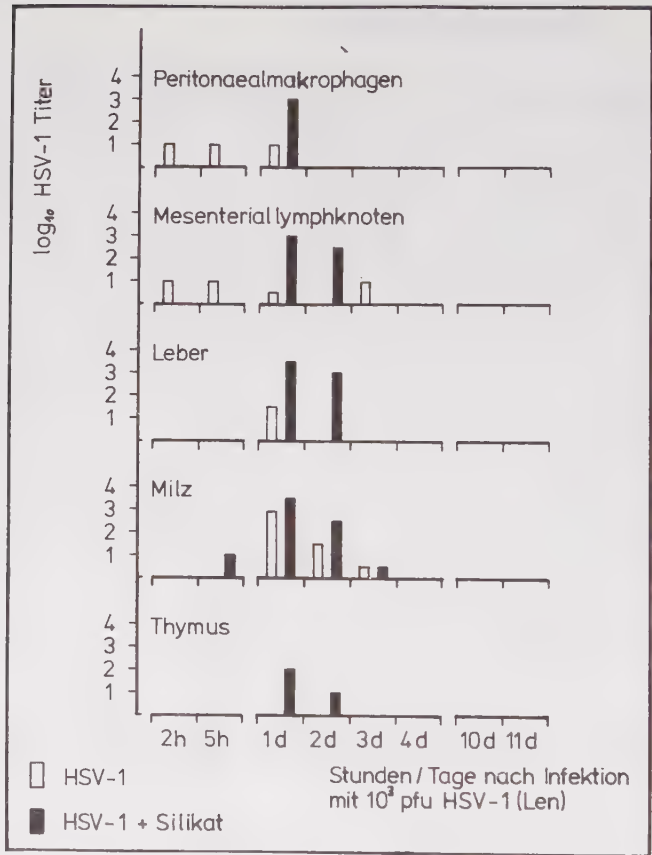


Abb. 5: Der Einfluß von Silikat auf die Virusclearance aus verschiedenen Organen.

Weibliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 infiziert. Die Hälfte der Tiere hatte 4 h vor der Infektion 30 mg Silikat in 0,5 ml Hanks-Lösung i.p. injiziert erhalten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Organe präpariert und auf das Vorhandensein von infektiösem Virus titriert.

Offene Balken markieren die Virustiter bei HSV-1 infizierten Kontrolltieren, geschlossene Balken bei HSV-1 infizierten Mäusen, die mit Silikat vorbehandelt wurden. Konnte kein Virus nachgewiesen werden, wird dies durch das Fehlen eines Balkens markiert.

3.3 Der Nachweis von infektiösem HSV und von HSV-Antigen in den Peritonealmakrophagen nach einer Primärinfektion

In einem zusätzlichen Versuch wurde untersucht, wie lange nach der i.p.-Infektion von NMRI-Mäusen in deren Peritonealmakrophagen Virus in infektiöser und in nicht-infektiöser Form nachweisbar war. Nach der Verabfolgung von 10^5 PFU HSV-1 (Tab. 8) konnte in dieser Zellpopulation am 1. und 2. Tag p.i. infektiöses Virus nachgewiesen werden. In Makrophagen, die bis zum 4. Tag nach Infektion gewonnen wurden, ließ sich im AK-Produktionstest das Vorhandensein von HSV-Antigen demonstrieren.

Tabelle 8: Der Nachweis von infektiösem HSV-1 und nicht-infektiösem HSV-1 Antigen in Peritonealmakrophagen.

	Zeitpunkt nach Infektion (Tag)						
	1	2	3	4	5	6	7
infektiöses HSV-1	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
nicht-infektiöses HSV-1 Antigen	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø

Weibliche NMRI-Mäuse wurden mit 10^5 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Peritonealmakrophagen gewonnen. Die adhärennten Zellen wurden auf den Virusgehalt und die Fähigkeit, in Mäusen die Bildung von Anti-HSV-Antikörpern zu induzieren, untersucht.

3.4 Die Wirkung von Silikat auf die Antikörper-Spiegel nach der Immunisierung mit einer Formalin-inaktivierten HSV-Vakzine

Eine Behandlung mit Silikat bei Mäusen, die mit der inaktivierten HSV-Vakzine immunisiert worden waren, ließ die Möglichkeit zu, überprüfen zu können, ob die durch Silikat induzierte Steigerung der Antikörper-Synthese beim infektiösen Virus nur auf die verstärkte Replikation des HSV in der Maus zurückzuführen war.

Wie die Tabelle 9 zeigt, steigerte eine Silikat-Gabe auch die AK-Antwort nach der Verabreichung einer Präparation von nicht-vermehrungsfähigem HSV-1.

Tabelle 9: Die Steigerung der Antikörperspiegel nach einer Immunisierung mit inaktivierter HSV-1 Vakzine durch Silikat.

Behandlung	HSV-Antikörpertiter (r.W.)	
	♀	♂
Kontrolle	48 ± 17	40 ± 10
Silikat	178 ± 71 ^a	118 ± 32 ^a

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 300 µg einer inaktivierten HSV-1 Vakzine immunisiert. Vier Stunden vor der Infektion erhielt die Hälfte der Tiere 30 mg Silikat in 0,5 ml Hanks' Lösung i.p. injiziert. 21 Tage nach der Immunisierung wurden die Tiere entblutet.

a: Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) der AK-Titer Kontrolle/Silikat

3.5 Die Antikörper-Spiegel nach einer Transfusion von syngenem Peritonealexsudatzellen

Durch i.p.-Verabfolgung von Silikat waren die residenten Makrophagen in der Bauchhöhle zerstört worden. Eine umgekehrte Ausgangssituation konnte durch eine Transfusion von Peritonealexsudatzellen bei syngenem Mäusen geschaffen werden. Injizierte man BALB/c- oder C57BL/6-Mäusen unmittelbar vor der Infektion den Ertrag einer Bauchhöhlenspülung an isolierten PEC von gleichgeschlechtlichen Tieren oder von Mäusen des anderen Geschlechts, so hatte dies keinen eindeutigen Einfluß auf die AK-Synthese.

3.6 Der Einfluß der Kulturüberstände von Makrophagen auf die Antikörperbildung

Die vorhergehenden Versuche mit Silikat legten die Vermutung nahe, daß Makrophagen - beispielsweise durch Sekretion löslicher Faktoren - eine supprimierende Wirkung auf die AK-Bildung ausüben könnten. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Peritonealmakrophagen von NMRI-Mäusen gewonnen und in serumfreiem Medium für 24 Stunden in Kultur gehalten. Die zellfreien Überstände dieser Kulturen wurden HSV-infizierten Mäusen 1 Stunde und 24 Stunden p.i. intraperitoneal verabreicht.

Aus der Tabelle 10 ist zu ersehen, daß die Injektion von Kulturüberständen sowohl residenter als auch 24 Stunden mit UV-inaktiviertem HSV in vitro inkubierter Makrophagen die HSV-AK-Bildung deutlich reduzierte. (Dieser Effekt ließ sich jedoch nicht bei allen Versuchen feststellen.)

Es sollten nun einige Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Antikörpersynthese getestet werden, von denen bekannt war, daß sie die Funktion von Makrophagen oder die HSV-Makrophagen-Interaktion beeinflussen könnten.

Tabelle 10: Die Senkung der HSV-Antikörper-Titer durch eine in-vivo-Gabe von Kulturüberständen residenter Makrophagen

in vivo Manipulationen	HSV-Antikörper-Spiegel (r.W.)
$\emptyset$ ¹	188 $\pm$ 33
Überstand residenter Makrophagen ²	98 $\pm$ 33 ^a
Überstand residenter Makrophagen ³ (UV-HSV in vitro)	119 $\pm$ 44 ^a

Weibliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit HSV-1 (Len), 3×10^3 PFU, infiziert. Zwei Stunden und 24 Stunden p.i. erhielten sie je 0,5 ml

- 1) normales BME-Medium;
- 2) zellfreien 24-Stunden-Überstand residenter NMRI-Peritonealmakrophagen oder
- 3) zellfreien 24-Stunden-Überstand residenter NMRI-Peritonealmakrophagen, die zuvor in vitro für 12 Stunden in Gegenwart von 10^8 PFU UV-inaktiviertem HSV-1 inkubiert worden waren.

21 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse entblutet.

Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe: a.

3.7 Die Wirkung von Indometacin auf die Antikörperbildung

Zu den vielen regulatorisch wirksamen Sekretionsprodukten von Makrophagen gehören unter anderem auch Prostaglandine (82). Ein Zugang zur Untersuchung ihrer Wirkung auf die AK-Antwort ergibt sich durch die Möglichkeit der Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Substanzen wie Indometacin.

Wurden Mäuse, die mit HSV-1 infiziert waren, mit Indometacin (70 µg über 3 Tage) behandelt, so erreichten sie deutlich höhere AK-Spiegel als unbehandelte Kontrolltiere, eine Verdoppelung der Indometacin-Dosis bewirkte eine weitere Steigerung der AK-Spiegel. Auch bei Tieren, die mit inaktivierter HSV-1-Vakzine immunisiert worden waren, ließen sich die HSV-Titer steigern. Die Tabelle 11 zeigt, daß es sowohl am Zeitpunkt der Infektion mit HSV-1, als auch noch 2 Wochen später möglich ist, durch eine Gabe von Indometacin die AK-Produktion zu verstärken.

Tabelle 11: Die Steigerung der Titer neutralisierender HSV-1 Antikörper durch Indometacin

Zeitpunkt der Verabreichung von Indometacin	HSV-Antikörperspiegel (r.W.)
Kontrolle	262 ± 58
Tag 1	307 ± 91
Tag 2	546 ± 75 ^a
Tag 3	766 ± 193 ^a
Tag 4	756 ± 247 ^a
Tag 5	713 ± 94 ^a
Tag 15	667 ± 182 ^a

Weiblichen NMRI-Mäusen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) 70 µg Indometacin i.p. injiziert. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

a: Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe

3.8 Der Einfluß von Dextransulfat 500 000 auf die Anti- körperbildung

Dextransulfat 500 000 verhindert die Aufnahme von HSV durch Makrophagen (54,68). Um festzustellen, ob sich dies auch auf die AK-Bildung bei der Primärinfektion auswirkte, wurden NMRI-Mäuse mit HSV-1 infiziert. Zwei Gruppen von Tieren waren mit unterschiedlichen Dosen Dextransulfat 8 Stunden a.i. vorbehandelt worden.

Aus der Tabelle 12 kann entnommen werden, daß die Gabe von Dextransulfat die HSV-Antikörperspiegel deutlich steigerte; bei einer Dosis von 10 mg war diese Steigerung signifikant.

Tabelle 12: Die Erhöhung der HSV-AK-Spiegel durch Dextransulfat 500 000

Dextransulfat	HSV-AK-Spiegel (r.W.)
Ø	272 ± 62
5 mg	363 ± 134
10 mg	553 ± 282 ^a

Weibliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) i.p. infiziert. Zwei Gruppen von Tieren waren 8 Stunden vor der Infektion mit Dextransulfat 500 000 i.p. vorbehandelt worden. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

a: Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe

3.9 Die Wirkung von Freundschem Adjuvans (FA) bei der experimentellen HSV-Infektion

Freundsches Adjuvans dient bei vielen Immunisierungsschemata zur Steigerung des Ausmaßes einer Immunantwort. Es war deshalb von Interesse, ob Freundsches Adjuvans in ähnlicher Weise wie Silikat und Indometacin in der Lage sein würde, die AK-Antwort gegen HSV zu steigern.

Gruppen von weiblichen und männlichen NMRI-Mäusen wurden wahlweise mit HSV-1 infiziert oder mit inaktivierter HSV-Vakzine immunisiert. Es wurde infektiöses Virus bzw. HSV-Antigen wie üblich nur in Lahn-Medium oder aber Virus bzw. Antigen suspendiert in inkomplettem (IFA) oder komplettem (CFA) Freundschem Adjuvans i.p. verabreicht.

Aus der Tabelle 13 kann entnommen werden, daß eine signifikante Steigerung der AK-Synthese bei der Gabe der inaktivierten Vakzine durch komplettes und inkomplettes FA erzielt wurde. Mit Ausnahme einer Wirkung des kompletten FA bei männlichen Tieren war die Suspendierung des infektiösen Virus hinsichtlich einer Steigerung der AK-Synthese erfolglos.

Die Behandlung HSV-1-infizierter Mäuse mit Silikat hatte also eine stärkere Vermehrung des Virus in den inneren Organen zur Folge. Trotzdem erfolgt die Virusclearance aus den inneren Organen gleich schnell wie bei den unbehandelten Kontrolltieren. Durch die Applikation von Silikat wurden die Titer der neutralisierenden HSV-Antikörper deutlich gesteigert, wenn Silikat an einem Zeitpunkt zwischen 4 Tagen a.i. und 12 Tagen p.i. verabreicht wurde. Auch nach der Immunisierung mit einer inaktivierten HSV-1-Vakzine konnte durch Verabfolgung von Silikat eine Anhebung der AK-Spiegel erzielt werden. Mäuse, die mit den Kulturüberständen residenter Peritonealmakrophagen behandelt wurden, hatten niedrigere AK-Titer als unbehandelte Kontrolltiere nach der HSV-Infektion. Durch eine Behandlung HSV-infizierter Mäuse mit dem Prostaglandinsynthese-Hemmer Indometacin, mit dem Phagozytose-Blocker Dextranulfat 500 000 und mit Freundschem Adjuvans konnten die Anti-HSV-Antikörperspiegel angehoben werden.

Tabelle 13: Die Wirkung von Freundschem Adjuvans auf die HSV-Antikörper-Produktion

HSV-Präparation		HSV-Antikörper-Spiegel (r.W.)		
		Kontrolle	IFA	CFA
infektiöses HSV-1	♀	239 ± 29	200 ± 52	203 ± 52
	♂	56 ± 22	69 ± 28	113 ± 37 ^a
inaktivierte HSV-1 Vakzine	♀	19 ± 11	56 ± 22 ^a	47 ± 24 ^a
	♂	18 ± 11	38 ± 15 ^a	38 ± 14 ^a

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) i.p. infiziert oder mit einer inaktivierten HSV-1 Vakzine immunisiert. Die jeweilige Präparation wurde entsprechend pur oder aber im Verhältnis 1:1 mit inkomplettem (IFA) oder komplettem (CFA) Freundschem Adjuvans gemischt verabreicht. 21 Tage nach der Infektion/Immunisierung wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe: a.

4. Der Einfluß von Interferoninduktoren und von Natural-Killer-Zellen auf die HSV-Antikörper-Titer

Interferone haben wichtige Mediatorfunktionen innerhalb des Immunsystems, speziell in der Frühphase von Immunreaktionen (56,238).

4.1 Die Beeinflussung der AK-Titer durch Poly-I:C(LC)

Es sollte deshalb festgestellt werden, inwiefern die Höhe der AK-Antwort durch Interferon beeinflusst werden konnte. Zur Anregung der endogenen Produktion von Interferon in der Maus wurde der Interferoninduktor Poly-I:C(LC) gewählt. Am Tag nach einer i.p.-Gabe von 100 µg Poly-I:C(LC) konnten in den Seren der behandelten Mäuse hohe Interferon-Titer nachgewiesen werden, die, je nach Stamm, zwischen 1:1600 und 1:6400 schwankten. HSV-1 infizierte NMRI-Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Poly-I:C(LC) behandelt.

Die Tabelle 14 zeigt, daß nach der Gabe von Poly-I:C(LC) vor der Infektion die Antikörper-Titer niedriger ausfielen als bei den Kontrolltieren. Gleichartige Ergebnisse für Tag (-1) wurden auch durch die Behandlung von Mäusen mit *Corynebacterium parvum* erzielt (Tab. 15). Wurde nach einer HSV-Infektion Poly-I:C(LC) verabreicht, so lagen die Antikörper-Spiegel signifikant höher als bei den Kontrolltieren (Tab. 14).

Tabelle 14: Der Einfluß von Poly-I:C(LC) auf die HSV-Antikörper-Titer

Behandlung	HSV-Antikörper-Titer (r.W.)
Kontrolle	216 ± 42
Poly-I:C(LC) Tag (-1)	30 ± 11 ^a
Tag 1	448 ± 73 ^a
Tag 5	297 ± 55 ^a
Tag 15	439 ± 91 ^a

Weibliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erhielten sie 100 µg Poly-I:C(LC) i.p. injiziert. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe: a.

Tabelle 15: Die Beeinflussung der HSV-Antikörper-Titer durch *Corynebakterium parvum*

Behandlung	HSV-Antikörper-Titer (r.W.)	
	♀	♂
Kontrolle	284 ± 37	64 ± 21
C. parvum	27 ± 13 ^a	22 ± 11 ^a

Weibliche und männliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Sieben Tage vor der Infektion erhielten die Tiere der einen Gruppe 0,1 ml C. parvum (Coparvax, 7 mg/ml) i.p. injiziert. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe: a.

4.2 Das Verhalten der HSV-Antikörper-Spiegel bei Beige-Mäusen

Die Rolle der Natural-Killer-Zellen (NK) für die Bewältigung einer Virusinfektion ist umstritten. NK-Zellen produzieren einerseits Interferone, werden aber auch durch Interferon aktiviert (56). Ein Modell zur Untersuchung ihres Beitrags zur Abwehrreaktion ist die "Beige"-Maus. Homozygoten (bg/bg) Tieren fehlt die Natural-Killer-Aktivität.

Natural-Killer-intakte C57BL/6J (+/+)- und -defekte C57BL/6J- (bg/bg)-Mäuse wurden mit 10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Der Vergleich der AK-Spiegel 21 Tage nach der Infektion ergab (Tab. 16), daß bei den Beige-Mäusen die Weibchen mehr und die Männchen weniger Antikörper bildeten als ihre NK-intakten Artgenossen.

Tabelle 16: Das Verhalten der HSV-Antikörpertiter bei C57BL/6J-Beige-Mäusen

Stamm	HSV-Antikörpertiter (r.W.)	
	♀	♂
C57BL/6J +/+, +/bg	40 ± 16	34 ± 8^a
C57BL/6J bg/bg	70 ± 29^b	18 ± 7

Natural-Killer-kompetente (+/+ oder +/bg) und Natural-Killer-defekte (bg/bg) C57BL/6J Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 infiziert und 21 Tage nach der Infektion entblutet.

Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) ♀/♂: b; +/bg/bg: a

5. Der Einfluß des T-Zell-Mitogens Bestatin auf die HSV-Antikörper-Bildung

HSV ist ein T-Zell-abhängiges Antigen (20). Es war deshalb von Interesse, den Einfluß von T-Lymphozyten auf die HSV-AK-Bildung während des Infektionsverlaufs genauer zu untersuchen.

Die Bedeutung von T-Lymphozyten für bestimmte immunologische Vorgänge kann durch eine in-vitro- oder in-vivo-Stimulation mit T-Zell-Mitogenen untersucht werden.

Bestatin ist ein seit etwa 10 Jahren bekannter Amino-peptidaseinhibitor, dessen immunpotenzierende Eigenschaften auch in der Immuntherapie maligner Tumoren ausgenutzt werden (152).

Bestatin stimuliert den DNA-Stoffwechsel in T-Lymphozyten; diese Wirkung wird durch Makrophagen vermittelt (87).

5.1 Die Abhängigkeit der Wirksamkeit von Bestatin vom Zeitpunkt der Verabfolgung

Zunächst sollte untersucht werden, ob das T-Zell-Mitogen Bestatin überhaupt einen Einfluß auf die Antikörperbildung gegen HSV-1 ausübt. Hierzu wurden mehrere Gruppen von NMRI-Mäusen mit HSV-1 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Bestatin behandelt.

Die Abbildung 6 zeigt, daß die Verabreichung von Bestatin tatsächlich die Höhe der Antikörperspiegel beeinflussen konnte. Eine signifikante Steigerung der 21 Tage p.i. gemessenen Titer neutralisierender Antikörper wurde durch eine Verabreichung von Bestatin zwischen dem 5. und dem 8. Tag p.i. erzielt; am 5. Tag p.i. wirkte Bestatin am deutlichsten.

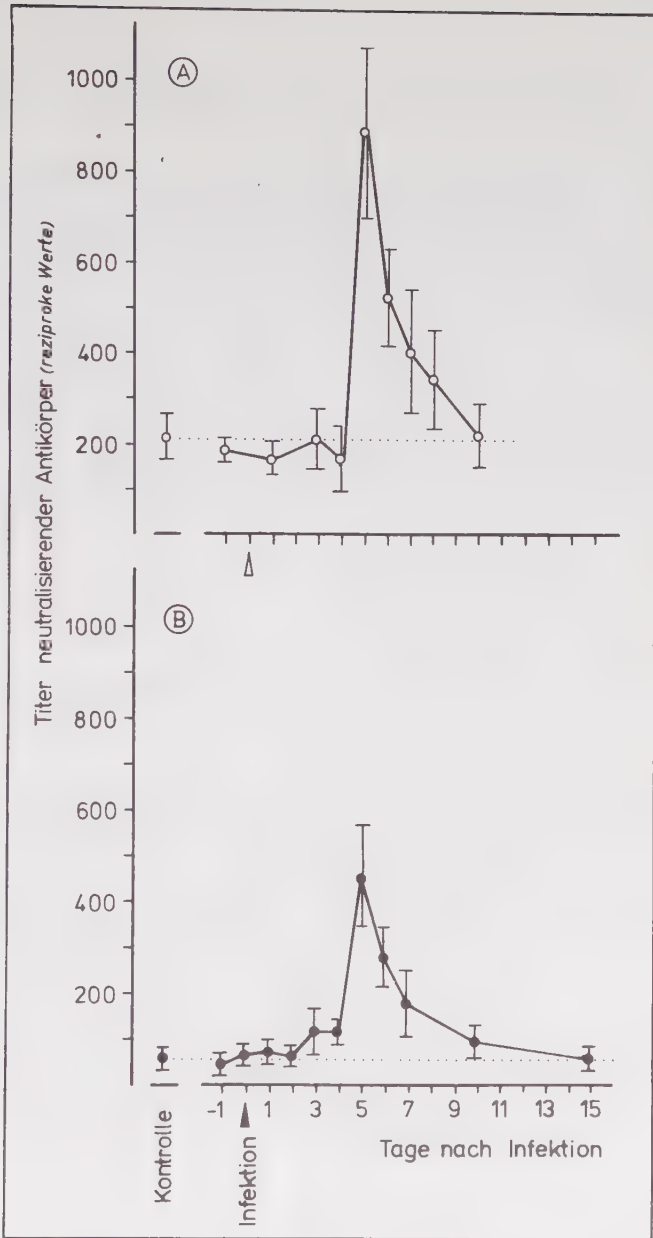


Abb. 6:

Der Einfluß von Bestatin auf die Bildung neutralisierender Antikörper als Funktion des Zeitpunktes der Verabreichung.
(weitere Erläuterungen s.S. 78)

Abb. 6: Der Einfluß von Bestatin auf die Bildung neutralisierender Antikörper als Funktion des Zeitpunktes der Verabreichung.

Weibliche (A) und männliche (B) NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erhielten die Tiere 230 µg Bestatin i.p. injiziert. Die Mäuse wurden 21 Tage nach der Infektion entblutet.

Die Antikörper-Titer der Bestatin-behandelten Tiere waren bei Weibchen (A) vom 5. bis zum 8. Tag p.i. statistisch signifikant höher als die Titer der Kontrollgruppe; bei den Männchen (B) war der Titerunterschied zur Kontrollgruppe vom 3. bis zum 10. Tag p.i. signifikant (Student-t-Test, $p < 0,05$).

5.2 Der Einfluß der Dosis auf die Wirksamkeit von Bestatin

Die oben verwendete Dosis von Bestatin war aufgrund der Ergebnisse von Thymidineinbaustudien (87,152) gewählt worden. Es sollte nun festgestellt werden, in welchen Dosisbereichen Bestatin auf die AK-Bildung wirken konnte. Am 5. Tag nach der HSV-1-Infektion wurden deshalb verschiedene Gruppen von Mäusen mit unterschiedlichen Dosen Bestatin behandelt.

Wie aus der Abbildung 7 zu ersehen ist, erhöhten Bestatin-Dosen von 1 ng/kg und mehr die 21 Tage nach der Infektion meßbaren AK-Spiegel. Die zweigipflige Dosis-Wirkungs-Kurve zeigte im Bereich bis 100 ng/kg eine Anhebung der Titer auf etwa 1:500, während bei 10 µg/kg und mehr Werte bis etwa 1:1000 erreicht wurden.

5.3 Der zeitliche Verlauf der Antikörper-Spiegel nach der Gabe von Bestatin

Als nächstes sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt die AK-Produktion nach der Gabe von Bestatin verstärkt wurde. Hierzu wurden NMRI-Mäuse mit HSV-1 infiziert, von denen die Hälfte am 5. Tag nach der Infektion eine Dosis Bestatin i.p. erhielt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dann Kontroll- und Bestatin-behandelte Mäuse entblutet.

Die AK-Spiegel der Bestatin-behandelten Tiere lagen zu jedem Zeitpunkt höher als die der Kontrollen (Abb. 8). Zwischen dem 12. und dem 21. Tag nach der Infektion stieg die Kurve bei der Bestatin-Gruppe wesentlich steiler an. Nach dem 21. Tag war weder bei Kontroll- noch bei Bestatin-behandelten Tieren mehr ein Anstieg zu verzeichnen.

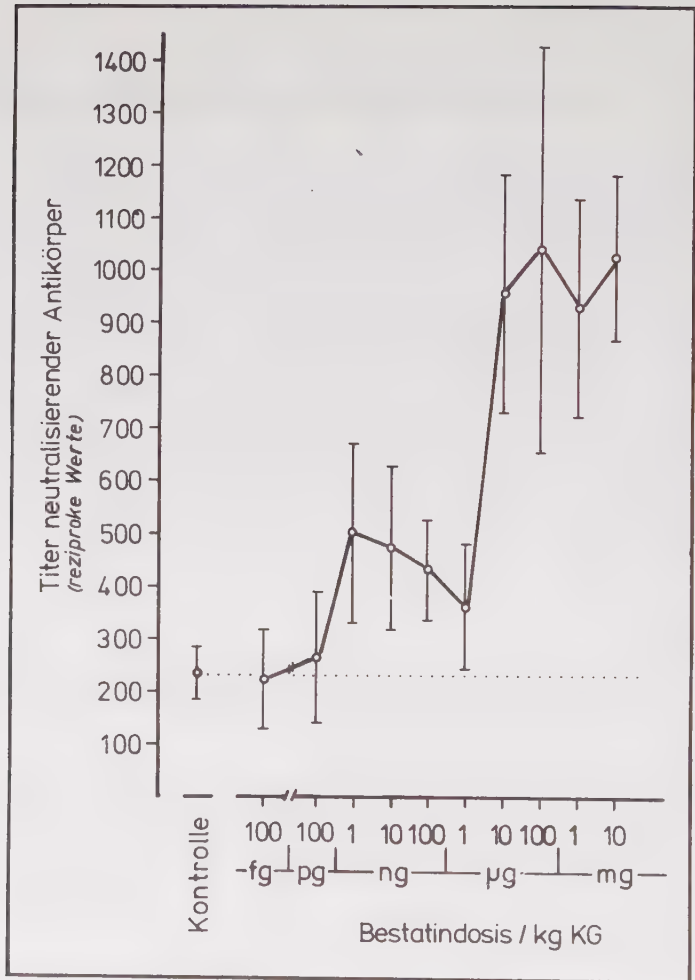


Abb 7:

Die Dosis-Wirkungs-Kurve von Bestatin.

Weibliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 i.p. infiziert. Am 5. Tag nach der Infektion wurde gruppenweise die angegebene Dosis von Bestatin verabreicht. Die Mäuse wurden 21 Tage nach der Infektion entblutet.

Die AK-Titer der Bestatin-behandelten Tiere waren ab einer Dosis von 1 ng/kg signifikant höher als die Titer der Kontrollgruppe (Student-t-Test, $p < 0,05$).

(Mittelwerte der Ergebnisse mehrerer Versuche mit analogem Kurvenverlauf.)

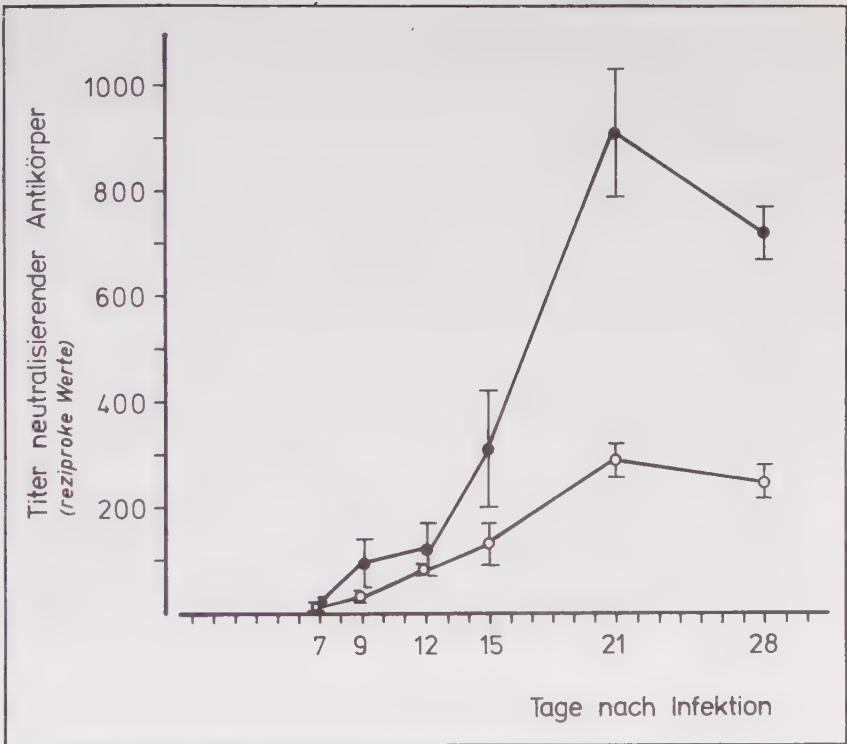


Abb. 8: Der zeitliche Verlauf der HSV-AK-Spiegel nach einer Gabe von Bestatin.

Weibliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. 5 Tage nach der Infektion erhielt die Hälfte der Tiere je 230 μ g Bestatin i.p. injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere entblutet.

(o HSV-1 Kontrolle, ● HSV-1 + Bestatin)

Die AK-Titer der Bestatin-behandelten Tiere waren vom 15. Tag p.i. an signifikant höher als die Titer der Kontrollgruppe (Student-t-Test, $p < 0,05$).

5.4 Der Einfluß von Bestatin auf den Infektionsverlauf

Nun sollte ermittelt werden, ob die Letalität der HSV-Infektion durch Bestatin beeinflusst werden konnte. Je zwei Gruppen von NMRI-Mäusen wurden mit 10^4 , 10^5 bzw. 10^6 PFU HSV-1 infiziert. Eine Gruppe für jeden Dosisbereich erhielt 5 Tage nach der Infektion Bestatin i.p.

Aus der Tabelle 17 kann man ersehen, daß allenfalls im niedrigen Infektions-Dosisbereich von 10^4 PFU Bestatin die Letalität reduzierte. In den höheren Dosisbereichen von 10^5 und 10^6 PFU war die Letalität bei den mit Bestatin behandelten Tieren sogar höher als bei den Kontroll-Mäusen.

Darüber hinaus sollte festgestellt werden, ob neben der AK-Antwort weitere Komponenten der Abwehrreaktion beeinflusst werden konnten. Durch eine frühzeitige Gabe von Bestatin sollte dessen Wirkung auf die Elimination von HSV-1 aus den viszeralen Organen geprüft werden. NMRI-Mäuse, die mit einer hohen Dosis von 10^5 PFU HSV-1 infiziert wurden, erhielten entweder 15 Stunden vor der Infektion oder 2 Stunden nach der Infektion 10 mg/kg Bestatin. Zwölf, 24 und 36 Stunden nach der Infektion wurden verschiedene Organe zur Titration auf den Gehalt an HSV entnommen.

Die Tabelle 18 zeigt, daß durch die Verabreichung von Bestatin kurze Zeit nach der Infektion keine Beeinflussung der Virus-clearance möglich war. In einem anderen Experiment wurde eine geringfügig beschleunigte Reduktion der HSV-Titer im Rückenmark gefunden.

5.5 Die Wirkung von Epibestatin

Für Bestatin wird ein Rezeptor auf der Zelloberfläche (von Makrophagen) angenommen, über den es seine Wirkung auf T-Lymphozyten auslösen soll (153). Es wurde deshalb untersucht, ob ein Bestatin-Enantiomer, das Epibestatin, welches nicht mit Aminopeptidasen interagiert (115), ebenfalls die HSV-AK-Bildung stimulierend beeinflussen konnte.

Tabelle 17: Der Einfluß von Bestatin auf die Letalität von HSV-Infektionen

HSV-Dosis (PFU)	Behandlung	% Überlebende am Tag						
		3	6	9	12	15	18	21
10^4	Kontrolle	100	100	100	100	67	67	67
	Bestatin	100	100	100	100	100	100	100
10^5	Kontrolle	100	100	100	84	84	84	84
	Bestatin	100	100	100	100	100	84	52
10^6	Kontrolle	100	84	67	50	50	50	50
	Bestatin	100	84	50	50	33	17	17

Gruppen von weiblichen NMRI-Mäusen wurden mit 10^4 (6 Tiere pro Gruppe), 10^5 (7 Tiere pro Gruppe) oder 10^6 (8 Tiere pro Gruppe) PFU HSV-1 (Len) infiziert. Fünf Tage nach der i.p.-Infektion erhielt die Hälfte der Tiere 230 µg Bestatin i.p. injiziert. Die Mäuse wurden über drei Wochen beobachtet, und die Zahl der toten Tiere wurde registriert.

Tabelle 18: Der Einfluß von Bestatin auf die HSV-1 Clearance aus den viszerale Organen

Organ	Behandlung	Gehalt der Organe an infektiösem HSV ($\log_{10}$ HSV-Titer)		
		12 h p.i.	24 h p.i.	36 h p.i.
Milz	Kontrolle	4,0	3,8	3,8
	Bestatin (-15)	3,8	3,8	3,0
	Bestatin (+ 2)	3,8	4,0	3,4
Leber	Kontrolle	3,4	3,4	4,4
	Bestatin (-15)	3,0	2,8	3,2
	Bestatin (+ 2)	2,8	3,8	3,8
Thymus	Kontrolle	2,4	2,0	1,6
	Bestatin (-15)	1,8	2,0	0,8
	Bestatin (+ 2)	2,3	2,2	2,0

Weibliche NMRI-Mäuse wurden mit 10^5 PFU HSV-1 i.p. infiziert. 15 Stunden vor der Infektion (-15) oder zwei Stunden nach der Infektion (+2) erhielt jeweils eine Gruppe der Tiere 230 µg Bestatin i.p. injiziert. Zwölf, 24 und 36 Stunden nach der Infektion wurden die betreffenden Organe präpariert und auf den Virusgehalt titriert.

Wie die Tabelle 19 zeigt, konnte überraschenderweise auch durch die Verabreichung von Epibestatin eine Steigerung der Spiegel neutralisierender HSV-Antikörper bewirkt werden. Die Eigenschaft des Moleküls als Aminopeptidaseinhibitor wirken zu können, ist offenbar keine Voraussetzung für die Fähigkeit, eine Steigerung der AK-Spiegel herbeiführen zu können.

Tabelle 19: Der Vergleich der Wirkungen von Bestatin und von Epibestatin auf die HSV-AK-Spiegel

Behandlung	HSV-Antikörpertiter (r.W.)
Kontrolle	273 ± 33
Bestatin	733 ± 276 ^a
Epibestatin	685 ± 82 ^a

Weibliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Am 5. Tag p.i. wurde je eine Gruppe mit 230 µg Bestatin bzw. 230 µg Epibestatin i.p. behandelt. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. 21 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse entblutet.

Statistisch signifikanter Unterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe: a.

5.6 Die Wirkung von Bestatin bei einer sekundären HSV-Infektion

Nachdem bei der primären HSV-Infektion die Wirksamkeit von Bestatin bezüglich einer Steigerung der HSV-AK-Synthese eine deutliche Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Verabreichung gezeigt hatte, sollte geprüft werden, ob sich auch bei einer sekundären AK-Antwort eine ähnliche Zeitabhängigkeit feststellen ließ. Weibliche und männliche NMRI-Mäuse erhielten 3 Wochen nach einer primären HSV-Infektion eine 2. Dosis von ebenfalls 10^3 PFU HSV-1 i.p. Zu verschiedenen Zeitpunkten danach wurde ihnen dann Bestatin i.p. gegeben.

Wie die Abbildung 9 zeigt, kann die höchste Steigerung der AK-Spiegel bei einer sekundären HSV-Infektion am Tag nach der Zweit-Infektion erzielt werden.

5.7 Der Einfluß von Silikat auf die Bestatin-vermittelte Steigerung der HSV-Antikörper-Titer

Eine mögliche Erklärung für die Latenzzeit, die vergehen mußte, bis Bestatin nach einer Primärinfektion wirksam werden konnte, war, daß Makrophagen durch bestimmte Mechanismen verhinderten, daß T-Lymphozyten früher auf die Verabreichung von Bestatin reagieren konnten. Die Ausschaltung der Makrophagen müßte es dann ermöglichen, daß Bestatin zu einem früheren Zeitpunkt wirken kann.

Weibliche NMRI-Mäuse wurden hierzu mit Silikat vorbehandelt, dann mit HSV-1 infiziert und erhielten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion Bestatin i.p.

Tatsächlich konnten bei Silikat-vorbehandelten Mäusen schon am 1. Tag p.i. durch eine Gabe von Bestatin die AK-Titer erhöht werden (Abb. 10). Ein analoger Effekt wurde nach Silikat-Bestatin-Behandlung bei Mäusen, die eine inaktivierte HSV-1-Vakzine erhalten hatte, beobachtet (Tab. 20).

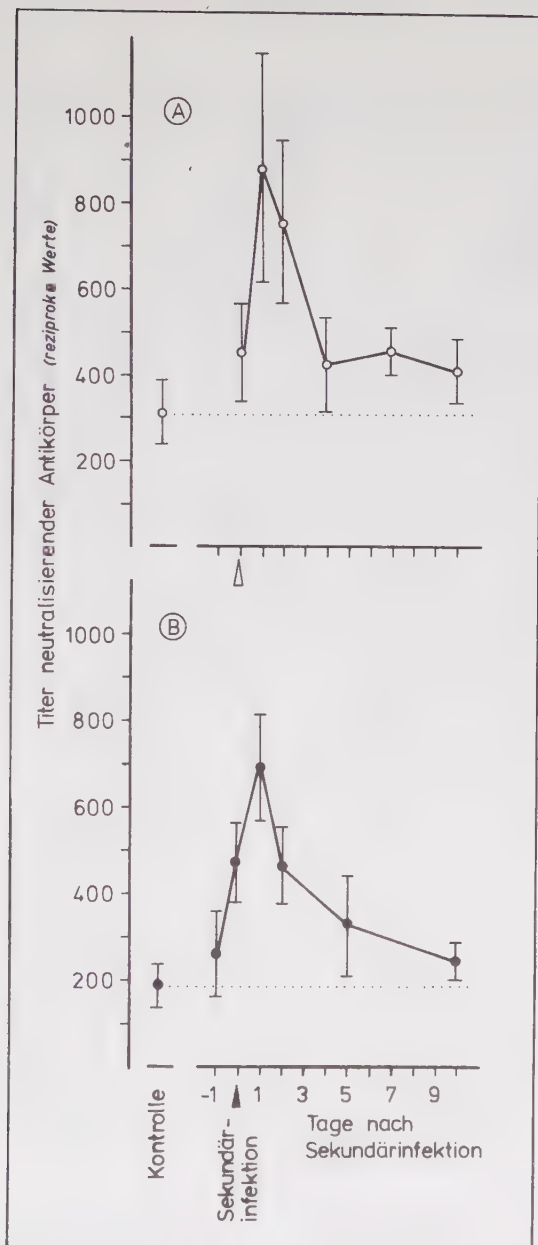


Abb. 9:

Die Wirksamkeit von Bestatin bei einer sekundären HSV-1 Infektion.
(nähere Erläuterungen s.S. 88)

Abb. 9: Die Wirksamkeit von Bestatin bei einer sekundären HSV-1 Infektion.

Weibliche (A) und männliche (B) NMRI-Mäuse wurden im Abstand von 3 Wochen zweimal mit je 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) i.p. infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (bezogen auf die Sekundärinfektion) erhielten die Tiere je 230 µg Bestatin i.p. verabreicht. Die Tiere wurden 21 Tage nach der Sekundärinfektion entblutet.

Die AK-Titer der Bestatin-behandelten Tiere waren bei den Weibchen (A) zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als die der Kontrolltiere; bei den Männchen (B) waren die Titer vom Tag 0 bis zum Tag 7 p.i. signifikant höher als bei den Kontrolltieren (Student-t-Test, $p < 0,05$).

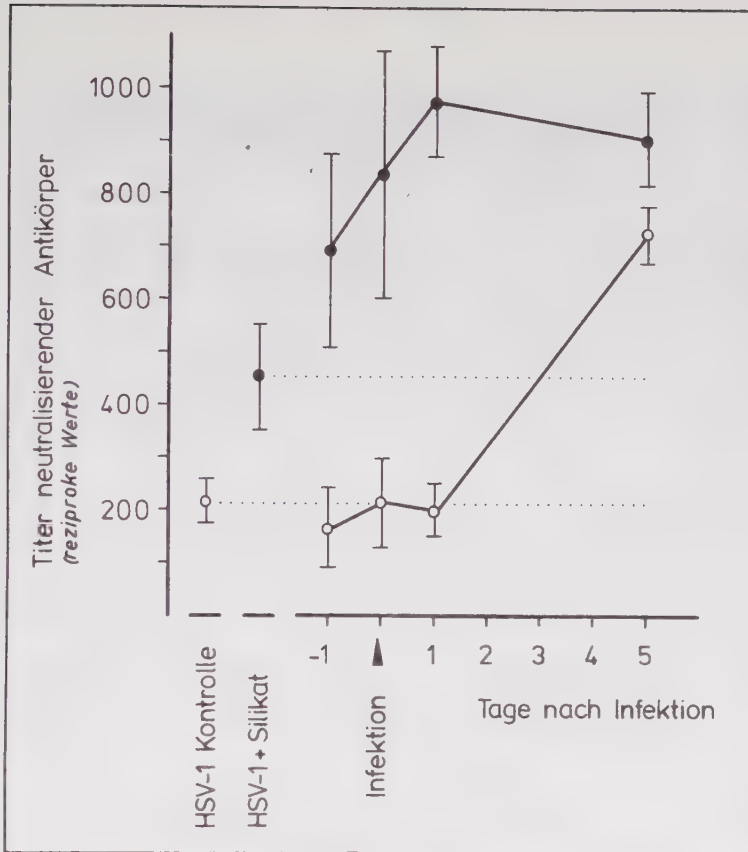


Abb. 10:

Die Beeinflussung des Zeitpunkts der Wirksamkeit von Bestatin durch Silikat.

Weibliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Verschiedene Gruppen (●) hatten 4 h vor der Infektion i.p. 30 mg Silikat in 0,5 ml Hanks'-Lösung erhalten (keine Silikatbehandlung o). Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren 230 µg Bestatin i.p. injiziert. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikante Titerunterschiede (Student-t-Test, $p < 0,05$).

Silikat,

- im Vergleich mit der Kontrollgruppe:
Bestatin Tag 5, Silikat + Bestatin (Tag -1, 0, 1, 5), Silikat;
- im Vergleich mit der Silikat-behandelten Gruppe:
Silikat + Bestatin (Tag -1, 0, 1, 5);
- im Vergleich mit den Bestatin-behandelten Gruppen:
die jeweils korrespondierende Gruppe Silikat + Bestatin.

Tabelle 20: Der Einfluß von Silikat auf die Bestatin-Wirkung nach einer Immunisierung mit inaktivierter HSV-1-Vakzine

Behandlung	HSV-Antikörpertiter (r.W.)
Kontrolle	48 ± 17
Silikat (-4) h	178 ± 71 ^a
Bestatin Tag 1	70 ± 31 ^b
Bestatin Tag 5	230 ± 57 ^a
Silikat (-4) h + Bestatin Tag 1	232 ± 56 ^{a,b}
Silikat (-4) h + Bestatin Tag 5	294 ± 111 ^a

Weibliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit einer inaktivierten HSV-1 Vakzine immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erhielten sie i.p. Injektionen von 30 mg Silikat in 0,5 ml Hank'-Lösung und/oder 230 µg Bestatin. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikanter Titerunterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe: a; signifikanter Titerunterschied zwischen zwei gekennzeichneten Gruppen: b.

Da die Zeitspanne der Unempfindlichkeit für Bestatin möglicherweise vom Infektionsort (Bauchhöhle) abhing, wurden NMRI-Mäuse in die Pfote infiziert und dann analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen mit Silikat und Bestatin behandelt. Wenn auch nicht so deutlich wie es nach der i.p.-Infektion der Fall ist, zeigte sich (Tab. 21), daß auch nach der HSV-Infektion in die Fußsohle Bestatin erst nach Ablauf einer Latenzzeit von 5 Tagen AK-steigernd wirksam werden konnte. Nach der Verabreichung von Silikat ließ sich die AK-Bildung auch hier schon durch eine Gabe von Bestatin am Tag nach der Infektion verstärken.

Tabelle 21: Die Wirkung von Bestatin nach einer intraplantaren Infektion mit HSV-1

Behandlung	HSV-Antikörpertiter (r.W.)
Kontrolle	113 ± 16
Silikat i.p.	217 ± 17 ^a
Silikat i.plant.	196 ± 11 ^a
Bestatin Tag 1 i.p.	111 ± 46
Bestatin Tag 5 i.p.	419 ± 71 ^a
Bestatin Tag 5 i.plant.	246 ± 68 ^a
Silikat i.p. + Bestatin Tag 1 i.p.	221 ± 54 ^a
Silikat i.plant. + Bestatin Tag 5 i.p.	303 ± 109 ^a

Weibliche NMRI-Mäuse wurden in die linke Hinterpfote mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 30 mg Silikat und/oder 230 µg Bestatin verabreicht. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikanter Titerunterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe: a.

5.8 Die Untersuchung von Makrophagenüberständen auf ihre Fähigkeit, die Unempfindlichkeit gegenüber Bestatin aufzuheben

Durch die Manipulation der Makrophagen mit Silikat war es möglich, den Refraktärzustand des Antikörper-bildenden Apparates für Bestatin zu verkürzen. Folglich lag es nahe zu untersuchen, ob die Sekretionsprodukte von Makrophagen in der Lage sein würden, diesen vorübergehenden Unempfindlichkeitszustand gegenüber Bestatin zu beeinflussen. Hierzu wurden Kulturen von Bauchhöhlen-Makrophagen angelegt, deren Spendertiere unterschiedlich vorbehandelt waren: Kontrolltiere ohne Vorbehandlung, HSV-infizierte Tiere und Silikat-behandelte Tiere. Diese zellfreien 24-Stunden-Überstände wurden dann anderen Mäusen 2 Stunden nach deren Infektion mit HSV-1 injiziert. Ein Teil dieser Mäuse erhielt am Tag nach der Infektion eine Dosis Bestatin.

Wie aus der Tabelle 22 zu ersehen ist, bewirkte die Injektion von Überständen der Makrophagen aus Silikat-behandelten Tieren und aus HSV-infizierten Tieren (3 bzw. 5 Tage nach Infektion gewonnen) allein eine Steigerung der AK-Titer. In Kombination mit Bestatin (am 1. Tag nach der Infektion) waren die Überstände der Silikat-behandelten Mäuse und in gewissem Umfang der HSV-infizierten Mäuse (1 Tag nach deren Infektion) deutlich AK-steigernd wirksam. Makrophagen sezernieren offenbar Faktoren, welche die Wirksamkeit von Bestatin beeinflussen.

5.9 Der Einfluß von Indometacin und von Poly-I:C (LC) auf die Empfindlichkeit des Antikörper-bildenden Apparates für Bestatin

Zu der Vielzahl der Sekretionsprodukte von Makrophagen gehören u.a. Prostaglandine und Interferon. Es sollte deshalb geprüft werden, ob sich eine Hemmung der Prostaglandinsynthese durch

Tabelle 22: Die Beeinflussung der Wirkung von Bestatin auf die HSV-AK-Titer durch Kulturüberstände von Peritonealmakrophagen

Behandlung	HSV-AK-Titer (r.W.)
Kontrollen	205 ± 45
Bestatin Tag 1	198 ± 53
Bestatin Tag 5	826 ± 128 ^a
KÜ resident	228 ± 53
KÜ Silikat	462 ± 194 ^a
KÜ HSV Tag 1	303 ± 121 ^c
KÜ HSV Tag 3	428 ± 37 ^{a,d}
KÜ HSV Tag 5	313 ± 69 ^a
Bestatin Tag 1 + KÜ resident	226 ± 85
Bestatin Tag 1 + KÜ Silikat	333 ± 37 ^{a,b,c}
Bestatin Tag 1 + KÜ HSV Tag 1	562 ± 79 ^{a,b,d}
Bestatin Tag 1 + KÜ HSV Tag 3	234 ± 46
Bestatin Tag 1 + KÜ HSV Tag 5	332 ± 193

Weibliche NMRI-Mäuse wurden mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) i.p. infiziert. Einige Versuchsgruppen erhielten zu den angegebenen Zeitpunkten 230 µg Bestatin i.p. injiziert. Verschiedenen Gruppen wurde 2 h nach der Infektion je 0,5 ml zellfreier 24-h-Kulturüberstand (KÜ) von NMRI-Makrophagen injiziert ($1,5 \times 10^7$ adhärenzte PEC in 5 ml BME ohne Serum). Es handelte sich um zellfreie Überstände von residenten Makrophagen (KÜ resident), von Makrophagen, deren Spendertiere am Tag vor der Spülung der Bauchhöhle 30 mg Silikat i.p. erhalten hatten (KÜ Silikat) oder von Makrophagen HSV-1 infizierter Mäuse, die am 1., am 3. bzw. am 5. Tag p.i. gewonnen worden waren. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikanter Titerunterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$)

- gegenüber der Kontrollgruppe: a;
- gegenüber Bestatin Tag 1: b;
- zwischen zwei gekennzeichneten Gruppen: c,d.

eine in-vivo-Gabe von Indometacin bzw. eine Verabfolgung des Interferoninduktors Poly-I:C(LC) auf den Zeitpunkt der Bestatin-Sensibilität der Maus nach HSV-1-Infektion auswirkte.

Die Tabelle 23 zeigt, daß Indometacin allein die AK-Spiegel nur geringfügig beeinflusste, während Poly-I:C allein die bereits früher beschriebene Steigerung der AK-Spiegel hervorrief. Wurde die Verabreichung von Bestatin am ersten Tag nach der HSV-1-Infektion kombiniert mit der Gabe von Indometacin oder von Poly-I:C(LC), so lagen die AK-Titer deutlich über den Werten, die durch eine Injektion von nur einer der drei Substanzen erzielt wurden. Durch die Verabreichung von Poly-I:C am 5. Tag nach der Infektion konnte der durch die Bestatinalgabe zu diesem Zeitpunkt erreichte Effekt nicht weiter verstärkt werden. Offenbar bewirken Indometacin und Poly-I:C(LC) in gleicher Weise wie Silikat und die beschriebenen Überstände von Makrophagenkulturen eine zeitliche Vorverlegung der Sensibilität für Bestatin bei primär mit HSV-1 infizierten Mäusen.

5.10 Die Prüfung einer Interferon-Induktion durch Bestatin

Da die alleinige Verabreichung von Poly-I:C(LC) nach der Infektion eine Steigerung der HSV-Antikörper bewirkt hatte, mußte die Frage gestellt werden, ob Bestatin selbst möglicherweise durch eine Induktion von Interferon AK-steigernd wirkte. Wir untersuchten deshalb Seren, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer i.p.-Injektion von Bestatin gewonnen waren, und Kulturüberstände der Peritonealmakrophagen dieser Mäuse auf das Vorhandensein einer Interferon-Aktivität. In keiner der getesteten Proben wurde Interferon nachgewiesen, während die als Kontrollen mitgeführten Seren Poly-I:C(LC)-behandelter C57BL/6-Mäuse stets eine hochtitrige Aktivität aufwiesen.

Tabelle 23: Der Einfluß von Indometacin und von Poly-I:C(LC) auf die Bestatin-Empfindlichkeit des Antikörper-bildenden Apparates

Behandlung	HSV-AK-Titer (r.W.)
Kontrolle	271 ± 46
Bestatin Tag 1	221 ± 48
Bestatin Tag 5	908 ± 173 ^{a,b}
Indometacin Tag 1	345 ± 93 ^{b,c}
Poly-I:C(LC) Tag 1	495 ± 137 ^{a,b,d}
Poly-I:C(LC) Tag 5	562 ± 162 ^{a,e}
Indometacin Tag 1 + Bestatin Tag 1	621 ± 134 ^{a,b,c}
Poly-I:C(LC) Tag 1 + Bestatin Tag 1	787 ± 197 ^{a,b,d}
Poly-I:C(LC) Tag 5 + Bestatin Tag 5	827 ± 92 ^{a,e}

Weibliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden sie mit Bestatin (23 µg i.m.), mit Indometacin (250 µg i.p.) bzw. mit Poly-I:C(LC) (100 µg i.p.) behandelt. Bestatin wurde hier i.m. verabreicht, um mögliche lokale Interaktionen mit den anderen Substanzen zu vermeiden. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikanter Titerunterschied (Studen-t-Test, $p < 0,05$)

- gegenüber der Kontrollgruppe: a;
- gegenüber Bestatin Tag 1: b;
- zwischen zwei gekennzeichneten Gruppen: c,d,e.

5.11 Die Wirkung von Bestatin auf die Antikörper-Bildung gegen Schafserythrozyten (SRBC)

Die Frühphase der humoralen Immunreaktion gegen HSV-1 zeichnet sich durch eine Unempfindlichkeit gegenüber dem T-Zell-Mitogen Bestatin aus. Es ergab sich nun die Frage, ob es sich hierbei um ein für die Herpes-Infektion spezifisches Phänomen handelte, oder ob Immunreaktionen allgemein in der Frühphase Bestatin-refraktär sind. Als einfaches Vergleichssystem bot sich hier die AK-Bildung gegen SRBC an. Mit Schafserythrozyten immunisierte NMRI-Mäuse wurden in Analogie zu den Versuchen mit der HSV-1-Infektion mit Silikat und Bestatin behandelt.

Bei Betrachtung der Hämolysintiter 3 Wochen nach der Immunisierung zeigte sich (Tab. 24), daß Bestatin am 1. und 5. Tag p.i. etwa gleich stark wirkte. Silikat allein steigerte die AK-Spiegel deutlich. Durch eine zusätzliche Gabe von Bestatin am Tag nach der Immunisierung konnte der Effekt von Silikat aber nicht mehr signifikant gesteigert werden.

Tabelle 24: Das Verhalten der Anti-SRBC-Hämolysintiter unter dem Einfluß von Silikat und von Bestatin

Behandlung	HSV-AK-Titer (r.W.)
Kontrolle	12 $\pm$ 8
Bestatin Tag 1	26 $\pm$ 14 ^a
Bestatin Tag 5	20 $\pm$ 8
Silikat (+4) h	32 $\pm$ 4 ^a
Silikat (+4) h + Bestatin Tag 1	35 $\pm$ 8 ^a

Weibliche NMRI-Mäuse wurden mit 0,5 ml einer 10 % SRBC-Suspension i.p. immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erhielten die Tiere 30 mg Silikat i.p. und/oder 230 μ g Bestatin i.p. 21 Tage nach der Immunisierung wurden die Mäuse entblutet.

Statistisch signifikanter Titerunterschied (Student-t-Test, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrollgruppe: a.

5.12 Die Beeinflussung der Antikörper-Spiegel durch Cyclosporin A

Das Immunsuppressivum Cyclosporin A hemmt wahrscheinlich gewisse von T-Helfer-Zellen ausgehende Signale und unterdrückt so beispielsweise die Induktion von T-Killer-Zellen (16,19, 100).

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen, die durch eine Bestatin-Applikation erzielt wurden, schien es sinnvoll zu untersuchen, ob der Bestatin-Effekt durch Cyclosporin A unterdrückt werden könnte. Herpes-infizierte Mäuse wurden deshalb sowohl mit Bestatin als auch mit Cyclosporin A behandelt. Eine alleinige Gabe von Cyclosporin A führte erstaunlicherweise zu einer mäßigen Steigerung der AK-Spiegel sowohl am ersten als auch am 5. Tag nach der Infektion (Tab. 25). Es war jedoch möglich, die am 5. Tag nach der Infektion durch Bestatin erzielte Anhebung der AK-Spiegel durch eine zusätzliche Verabreichung von Cyclosporin A in den Bereich der Werte der Kontrollgruppe (nur HSV-1) zu senken.

Das T-Lymphozyten-Mitogen Bestatin steigerte die Pegel der neutralisierenden Antikörper stark, wenn es am 5. Tag nach einer primären oder am ersten Tag nach einer sekundären HSV-1-Infektion verabreicht wurde. Nach einer Vorbehandlung der Mäuse mit Silikat, mit Indometacin oder mit Poly-I:C(LC) bzw. mit Kulturüberständen von Peritonealmakrophagen, die einen Tag nach Infektion mit HSV-1 oder nach Applikation von Silikat gewonnen worden waren, zeigte Bestatin schon am ersten Tag nach der Primärinfektion seine maximale Wirkung. Die Wirksamkeit von Bestatin und von Silikat nach einer HSV-1-Infektion unterschied sich in ihrem Ausmaß und in ihrer Zeitabhängigkeit deutlich von der Wirksamkeit nach einer Immunisierung von Mäusen mit Schafserthrozyten.

Tabelle 25: Die Antagonisierung der HSV-Antikörper-steigernden Wirkung von Bestatin durch Cyclosporin A

Behandlung	HSV-AK-Titer (r.W.)
Kontrolle	218 ± 73
Cyclosporin A Tag 1	361 ± 180
Cyclosporin A Tag 4/5	307 ± 72 ^a
Bestatin Tag 4/5	540 ± 219 ^{a,b}
Cyclosporin A Tag 4/5 + Bestatin Tag 4/5	254 ± 77 ^b

Weibliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erhielten die Tiere 230 µg Bestatin bzw. 500 µg Cyclosporin A i.p. injiziert. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

Statistisch signifikanter Titerunterschied gegenüber der Kontrollgruppe: a;
signifikanter Titerunterschied zwischen zwei gekennzeichneten Gruppen: b
(Student-t-Test, $p < 0,05$).

6. Die Wirkung von Cyclophosphamid auf die HSV-Antikörper-Spiegel

Cyclophosphamid findet in höherer Dosierung als zytostatisch wirksames Immunsuppressivum breiten Einsatz. Niedrige Dosen von Cyclophosphamid können offenbar vorwiegend T-Suppressorzellen unterdrücken (182,183,200).

Um festzustellen, inwieweit und in welchem Zeitraum Suppressorwirkungen auf die AK-Antwort nach HSV-Infektion ausgeübt werden, wurden Mäuse mit HSV infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Cyclophosphamid entweder in hoher oder in niedriger Dosierung behandelt.

Die Abbildung 11 zeigt, daß eine Dosis von Cyclophosphamid vor der Infektion verabfolgt die AK-Spiegel steigerte, während die Gabe hoher Dosen nach der Infektion die AK-Titer senkte. Hingegen bewirkte eine niedrige Dosis Cyclophosphamid zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine Erhöhung der AK-Titer.

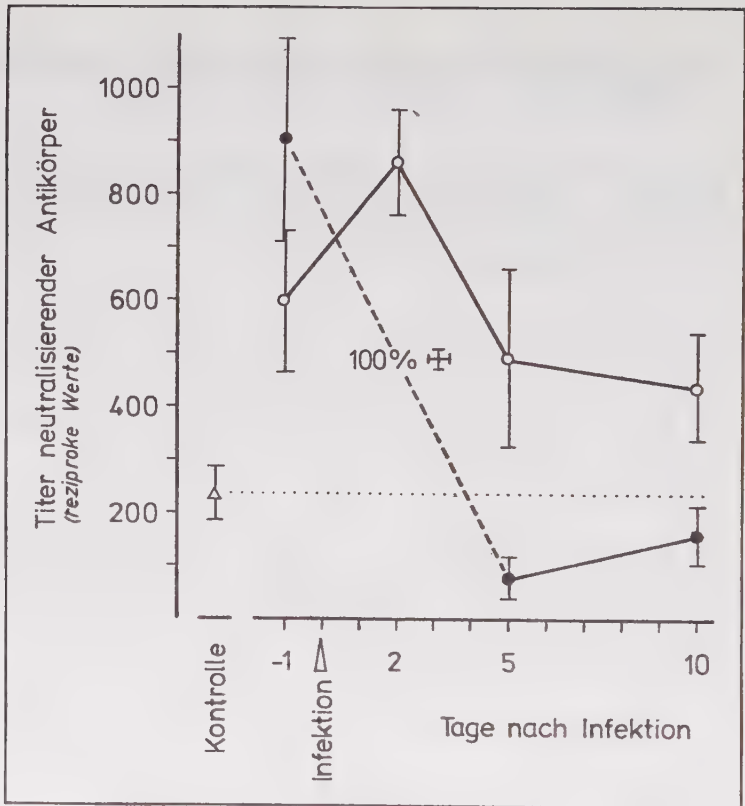


Abb. 11: Die Beeinflussung der HSV-1-Antikörper durch Cyclophosphamid.

Weibliche NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erhielten die Tiere gruppenweise 20 mg/kg (○) bzw. 100 mg/kg (●) Cyclophosphamid i.p. injiziert. 21 Tage nach der Infektion wurden die Tiere entblutet.

In den Gruppen der Mäuse, die mit 100 mg/kg Cyclophosphamid behandelt worden waren, starben nach Gabe der Substanz am Tag (-1) 20 %, am Tag 2 100 % der Tiere. Die Todesfälle wurden zwischen dem 10. und dem 18. Tag p.i. registriert.

Von den Tieren, welche eine hohe Dosis Cyclophosphamid erhalten hatten, hatte die Gruppe Tag (-1) signifikant höhere Titer als die Kontrollgruppe; nach Gabe der hohen Dosis an den Tagen 5 und 10 lagen die Titer signifikant niedriger. Alle Versuchsgruppen, die mit der niedrigen Dosis behandelt worden waren, hatten signifikant höhere AK-Titer als die Tiere der Kontrollgruppe (Student-t-Test, $p < 0,05$).

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von bestimmten Viruseigenschaften, von den Infektionsbedingungen, von unterschiedlichen physiologischen Faktoren und von immunologischen Parametern auf das Ausmaß der HSV-1-spezifischen Antikörperbildung in der primär infizierten Maus untersucht werden.

1. Allgemeine Aspekte der Bildung neutralisierender Antikörper in mit HSV-1 primär infizierten Mäusen

Zunächst wurde das verwendete Tiermodell der Primärinfektion von Mäusen mit subletalen HSV-Dosen bezüglich der Antikörperbildung näher charakterisiert:

Nach einer Infektion mit 10^3 PFU HSV-1 (Lennette) konnten IgM-Antikörper ab dem 5. Tag p.i. nachgewiesen werden. Nach dem 9. Tag p.i. stiegen die neutralisierenden Gesamtantikörper stärker als die IgM-Antikörper und erreichten 3 Wochen p.i. stabile Werte. Der Zeitpunkt des Auftretens von meßbaren Antikörpern nach experimentellen HSV-Infektionen bewegt sich in der Literatur zwischen dem 3. und dem 7. Tag p.i. (23,33,142, 148,187,201,256). Lediglich bei neugeborenen Mäusen konnten erst 13 Tage nach der Immunisierung mit einem attenuierten Stamm Antikörper nachgewiesen werden (106). Obgleich das ELISA-Verfahren wesentlich empfindlicher ist, als es der Neutralisationstest oder die KBR sind (150), kann es Antikörper nicht zu einem früheren Zeitpunkt als die letztgenannten Methoden erfassen (142,148). Der Inokulationsort hat offenbar keinen entscheidenden Einfluß auf den Zeitpunkt des Auftretens von neutralisierenden Antikörpern (23,142,148,256). Bei Kaninchen (201) traten die Antikörper im Durchschnitt etwas später auf als bei Mäusen (33,142,148,187,256). Nach unseren Resultaten besitzt die Größe des Virusinokulums einen Einfluß auf den Zeitpunkt des Auftretens der Antikörper, da eine Dosis

von 10^5 PFU bereits am 4. Tag p.i. einen positiven Antikörper-Nachweis ergab. Die Virusdosis beeinflusste auch die Höhe der endgültigen, 21 Tage p.i. meßbaren Antikörper-Spiegel. Es muß in Betracht gezogen werden, daß infolge des Versterbens mancher Tiere nach einer Infektion mit hohen HSV-Dosen eine gewisse Selektion guter AK-Bildner zur Ermittlung von zu hohen Titer-Mittelwerten geführt hat.

Weibliche Tiere zeigten unabhängig von der Virusdosis höhere AK-Spiegel als männliche Mäuse. Dieser Unterschied war bei mittleren Virusdosen (10^2 bis 10^4 PFU) besonders ausgeprägt. Mit steigenden Virusdosen nahm nach der Infektion mit HSV-1 (Lennette) auch die Menge der produzierten Antikörper zu. Eine weitere Größe mit Einfluß auf die Höhe der AK-Spiegel war der Inokulationsort. Die höchsten AK-Titer wurden nach einer intraperitonealen Infektion gemessen. Nach der Infektion in die Fußsohle oder nach einer subcutanen Infektion lagen die AK-Pegel wesentlich niedriger. Diese Differenzen sind wahrscheinlich durch die verschieden starke Vermehrung des Virus im Bereich der Eintrittspforte und durch Unterschiede im Ausbreitungsmodus mitbestimmt.

Die pathobiologische Heterogenität ist bei HSV-1-Stämmen stark ausgeprägt. In Abhängigkeit von den genetischen Voraussetzungen (Enzyme, Strukturproteine) kommen Wildstämme jeglichen Pathogenitätsgrades vor. Das Fehlen bestimmter Enzyme, z.B. der Thymidinkinase, ist oft mit einer sehr geringen Pathogenität assoziiert, jedoch spielen auch andere Faktoren, besonders solche, die einen Einfluß auf die Neuropathogenität haben, eine Rolle. Wir haben einige HSV-Stämme unterschiedlicher Pathogenität im Hinblick auf die durch sie induzierte AK-Antwort untersucht. Die Differenzen bezüglich der Pathogenität werden durch die unterschiedlichen Mortalitätsraten dokumentiert: Die HSV-1-Stämme WAL und ANG(path) erwiesen sich als sehr pathogen, während nach einer Infektion mit den Stämmen Len, IES, HFEM und ANG jeweils nur eine niedrige oder keine Mortalität zu verzeichnen war. Bei einer Infektion mit

dem HSV-1 (ANGpath) war die Mortalität nach einer Infektion mit 3×10^3 PFU niedriger als nach der Infektion mit 10^2 PFU. Dieses Phänomen, welches im Sinne einer Autointerferenz zu deuten ist, war bei HSV-1 (WAL) hier nicht festzustellen. Andere Autoren konnten jedoch nach einer Infektion von HSV-resistenten C57BL/6-Mäusen auch für den Stamm WAL eine Autointerferenz nachweisen (257). Die hier beobachtete Pathogenität der HSV-1-Stämme für NMRI-Mäuse korreliert nicht mit ihrer in-vitro-Vermehrung in den Makrophagen der Bauchhöhle (63). Aufgrund der beobachteten Autointerferenz-Phänomene ist es problematisch, für diese Viren präzise eine LD_{50} (Letaldosis für 50 % der Tiere) zu ermitteln. Oftmals ist die Kurve der Mortalität als Funktion der Virusdosis mehrgipflig.

Die AK-Spiegel stiegen bei den wenig pathogenen Stämmen Len, IES, HFEM und ANG an, wenn mit 3×10^3 PFU statt mit 10^2 PFU HSV-1 infiziert wurde. Bei den hochpathogenen Stämmen WAL und ANGpath war bei einer Steigerung der Virusdosis ein leichter Titerabfall zu verzeichnen. Die gemessenen Spiegel neutralisierender Antikörper spiegeln nicht nur die Humoralimmunität der Antigene des jeweiligen Stammes wider. Vielmehr finden hier auch die Menge von induziertem Interferon und die Vermehrungsaktivität des Virus in der Maus Ausdruck. Besonders ist das unterschiedliche Verhalten der Stämme ANG und ANGpath bezüglich der AK-Bildung. Die AK-Pegel fielen nach einer Infektion mit ANGpath jeweils höher aus als nach einer Gabe von ANG. ANG fehlt die Neuropathogenität nach peripherer Infektion, während ANGpath, der aus ANG nach mehrfachen Gehirn-Passagen bei Mäusen kloniert wurde (92), Zugang zu den Strukturen des zentralen Nervensystems bekommt. Beide Stämme vermehren sich in vivo und in vitro gleich stark und induzieren in gleichem Ausmaß Interferon und Natural-Killer-Aktivität (63,108). Laut Literatur konnte in einem anderen Fall gezeigt werden, daß der apathogene Klon eines HSV-1-Stammes im Gegensatz zum pathogenen trotz kreuzreagierender Antigendeterminanten in vitro durch Interferon und durch zelluläre Mechanismen wesentlich stärker in seiner Vermehrung gehemmt wurde (221). ANGpath weist gegenüber ANG zwei Deletionen auf, deren

eine (400 BP) sich im Bereich des Gens von Glykoprotein gD befindet. Glykoprotein D-spezifische Antikörper sollen einen wichtigen Beitrag zur Virusneutralisation leisten (30). Verschiedene Überlegungen könnten die unterschiedlich hohen Antikörper-Spiegel nach Infektionen mit ANG und ANGpath erklären: Einmal wäre es möglich, daß der von der Deletion betroffene Bereich des Gens von gD entweder keine proteinogenen Informationen enthält oder aber, daß der betreffende Bereich des Proteinmoleküls für die Bindung neutralisierender Antikörper irrelevant ist. Eine andere Erklärung wäre, daß durch die Deletionen Strukturen fehlen, die suppressorische Einflüsse auf die AK-Bildung ausüben. Schließlich könnte man daran denken, daß im Zuge des ZNS-Befalls durch ANGpath vegetative oder neuro-endokrine Mechanismen ausgelöst werden, welche eine Verstärkung der Immunantwort bewirken.

Es konnte also gezeigt werden, daß eine Reihe von Einflüssen, welche durch die Versuchskonzeption festgelegt werden können - dem Inokulationsort, der Virusdosis und dem Zeitpunkt, an dem die Serumprobe gewonnen wird - sowie die Eigenschaften des zur Infektion eingesetzten HSV-Stammes die Höhe der meßbaren HSV-AK-Spiegel beeinflussen.

2. Der Einfluß verschiedener physiologischer Faktoren auf die HSV-Antikörper

Die Immunreaktionen in einem Organismus werden von den unterschiedlichsten exogenen und endogenen Faktoren beeinflusst. Hier wirken sich u.a. das Alter, der Ernährungszustand, ausreichende Zufuhr von Spurenelementen und Vitaminen und hormonelle Einflüsse aus. Die Fähigkeit des Immunsystems, auf ein gegebenes Antigen adäquat zu reagieren und die Kooperation immunkompetenter Zellen im Rahmen der Immunantwort unterliegen der Kontrolle von Histokompatibilitätsgenen. Die Expression der entsprechenden Genprodukte durch die Zellen des Im-

munsystems ist einerseits Ausdruck der "Selbst"-Identität, andererseits aber auch abhängig vom Aktivierungszustand (Ia-Antigene) (101).

Wir untersuchten zunächst den Einfluß von genetischen Faktoren auf die AK-Antwort nach HSV-1-Infektionen und verglichen hierzu die Titer bei verschiedenen Inzucht-Mäusestämmen. Hierbei zeigte sich, daß die AK-Spiegel 21 Tage p.i. von Stamm zu Stamm sehr unterschiedlich ausfielen. Diese Unterschiede waren bei den Weibchen, deren Titerwerte 2- bis 9fach so hoch wie die der Männchen des gleichen Stammes ausfielen, besonders deutlich ausgeprägt. Es war jedoch nicht möglich, bestimmte H-2-Haplotypen oder bestimmte Background-Genome mit dem Ausmaß der AK-Antwort zu korrelieren. Bei diesen Untersuchungen wurde vorausgesetzt, daß die Kinetik der Produktion von Antikörpern gegen HSV-1 sich bei allen verwendeten Mäuse-Stämmen so verhält wie bei den NMRI- und den B10.A(5R)-Mäusen. Beim Vergleich der in-vivo-Resistenz verschiedener Mäuse-Stämme konnte LOPEZ ebenfalls keine Assoziation der Sensibilität oder der Unempfindlichkeit gegenüber HSV mit bestimmten H-2-Haplotypen feststellen (118). Zwischen den von uns ermittelten AK-Spiegeln und dem Grad der von LOPEZ untersuchten Resistenz bei den entsprechenden Mäuse-Stämmen besteht gleichfalls keine Korrelation. Beim Vergleich der AK-Titer von männlichen Mäusen verschiedener Inzuchtstämme 7 Tage nach einer HSV-Infektion konnten ZAWATZKI et al. keine Differenzen finden (256), was nach Kenntnis unserer Ergebnisse erklärlich ist.

Besonders hohe AK-Spiegel zeigte der zum Vergleich mitgetestete Auszuchtstamm NMRI. Nach der Kreuzung einer (weißen) NMRI-Maus mit einer (schwarzen) C57BL/6-Maus (schwacher HSV-AK-Bildner) produzierten die Nachkommen mit schwarzem Fell mehr HSV-AK als ihre gleichgeschlechtlichen braunen Geschwister. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß Gene für Eigenschaften des Fells in Beziehung zu Genen stehen, welche die AK-Antwort beeinflussen. In der Tat wurden auf dem Chromosom 17 der Maus, welches den H-2-Locus trägt, auch Gene, die das Haarwachstum beeinflussen, gefunden (101).

In mehreren beschriebenen Versuchen zeigte sich deutlich, daß die weiblichen Tiere höhere AK-Spiegel als die Männchen des gleichen Stammes produzierten. Nach einer primären Infektion mit dem HSV-1 waren die AK-Titer bei den Weibchen nur nach der i.p.-Verabfolgung des Virus signifikant höher als bei den Männchen, während nach der Immunisierung mit der Formalin-inaktivierten Vakzine der Titervorsprung der Weibchen nach der i.plant.-Verabfolgung signifikant war.

Geschlechtsabhängige Unterschiede der immunologischen Reaktivität sind bekannt. So haben Frauen höhere Immunglobulinspiegel als Männer (48), eine stärkere Resistenz gegen Infektionen, jedoch auch eine größere Chance, an Autoimmunkrankheiten zu erkranken (149). Es konnte gezeigt werden, daß Androgene meist eine immunsuppressive Wirkung haben (31,109,149), während Östrogene Immunreaktionen verstärken (109,177). Eine Abhängigkeit des Ausmaßes von Immunantworten vom Menstruationszyklus ist bei Mäusen beschrieben worden (107). Auch verläuft eine experimentelle intravaginale HSV-Infektion beim Vorliegen erhöhter Plasmaspiegel von Progesteron bedeutend schwerer (10).

Für uns war die Frage von Interesse, ob die beobachteten Differenzen der AK-Antwort bei weiblichen und bei männlichen Mäusen nur auf den Wirkungen geschlechtsspezifischer Steroidhormonspiegel beruhen, oder ob zusätzliche Faktoren eine Rolle spielen. Durch eine Ovariectomie wurden die AK-Spiegel beiden weiblichen Mäusen vermindert, und bei den Männchen bewirkte eine Kastration eine Steigerung der AK-Titer. Nach diesen Manipulationen konnte kein signifikanter Titerunterschied zwischen Weibchen und Männchen mehr festgestellt werden. Eine Möglichkeit zum Ausschalten von Androgenwirkungen besteht in der Verabreichung von antiandrogen wirksamen Substanzen wie Cyproteronacetat (progestagene Komponente) oder Cyproteron (164,247). Die Gabe der Antiandrogene hatte bei männlichen Mäusen einen Anstieg der AK-Pegel zur Folge. Bei den Weibchen wirkte Cyproteronacetat supprimierend, während Cyproteron zu bestimmten Zeitpunkten die AK-Titer steigerte. Offenbar wirken bei den weiblichen Mäusen physiologische Androgenspiegel

(20fach niedriger als bei Männchen) noch immer suppressorisch auf die AK-Antwort, die aber nicht zu jedem Zeitpunkt durch Androgene beeinflusbar ist.

Die bisherigen Beobachtungen gingen von Faktoren aus, welche die Rahmenbedingungen für die Aktivität von immunkompetenten Zellen beeinflussen. Als nächstes sollten nun die Wirkungen von Zellen untersucht werden, welche unmittelbar an der Entstehung und an der Regulation einer AK-Antwort beteiligt sind.

3. Die Bedeutung der Makrophagen für die HSV-Antikörper-Antwort

Makrophagen besitzen vielfältige Funktionen im Rahmen der Infektabwehr. Hierbei ist einerseits ihre Fähigkeit zur Phagozytose und zur intrazellulären Spaltung bzw. Inaktivierung von ingestiertem Material von Bedeutung, andererseits ihr Vermögen, lösliche Effektormoleküle zu sezernieren und schließlich ihre Befähigung zur Antigen-Präsentation und zur Sekretion von immunregulatorischen Monokinen (z.B. Il-1).

Eine Möglichkeit zur selektiven Schädigung von Makrophagen ergibt sich durch die Verwendung von Silikat. In vitro wird Silikat rasch von Makrophagen phagozytiert. Man nimmt an, daß die Substanz die Wand von Phagolysosomen schädigt, was zu einem Austritt von Enzymen in das Zytoplasma führt und so ein Absterben der Zelle bewirkt (2). Nach einer in-vivo-Verabreichung von Silikat i.p. kommt es an den folgenden Tagen zu einem starken Anstieg der Makrophagenzahl in der Bauchhöhle. Es handelt sich um monozytäre Zellen, die aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden (230) und in die Bauchhöhle gelangen (21). Als Reiz hierfür werden Stoffe angesehen, die durch die Einwirkung von Silikat aus den residenten Peritonealmakrophagen freigesetzt werden, wie Colony-Stimulating Factors (165), bzw. solche, deren Bildung durch Lysatprodukte der Makrophagen induziert werden.

Bei Mäusen, die mit Silikat vorbehandelt worden sind, nehmen wesentlich mehr HSV-Infektionen einen letalen Ausgang (128, 138, 208, 258).

In unserem System einer subletalen HSV-Infektion bewirkte eine Behandlung mit Silikat eine starke Steigerung der AK-Titer, die bei männlichen Mäusen verhältnismäßig stärker ausgeprägt war, so daß sich schließlich die HSV-AK-Spiegel der Weibchen und der Männchen nicht mehr unterschieden. Man könnte vermuten, daß zumindest bestimmte Funktionen von Makrophagen, etwa die Initiation und Regulation von AK-Antworten, durch Androgene beeinflusbar sind. Ein adoptiver Transfer von Peritonealexsudatzellen hatte keinen klar erkennbaren Einfluß auf die AK-Antwort. Dies läßt darauf schließen, daß nicht geschlechtsgebundene konstitutive Eigenschaften der Makrophagen, wie sie für die Resistenz beschrieben worden sind (136), sondern eher das (hormonale) Milieu der Bauchhöhle des Empfängers für die Ausprägung der AK-Antwort verantwortlich ist. Silikat konnte eine Steigerung der AK-Spiegel bewirken, wenn es zwischen dem 4. Tag vor und dem 12. Tag nach einer Infektion mit HSV-1 verabreicht wurde.

Verschiedene Mechanismen kommen als Ursache für diese Wirkung von Silikat in Frage. Zunächst muß daran gedacht werden, daß nach der Zerstörung der Makrophagenbarriere durch eine Verabreichung von Silikat kurz vor der Infektion (Tag (-2), Tag (-1), Tag (0)) eine verstärkte Vermehrung von HSV in den viszerale Organen erfolgen könnte (21, 137). Die Titration verschiedener Organe von HSV-infizierten Tieren zeigte, daß bei den Silikat-behandelten Tieren zwar höhere Virustiter in den Organen festzustellen sind als bei den Kontrolltieren, jedoch erfolgte in beiden Gruppen die Virusclearance gleich schnell. Die größeren Virusmengen im Organismus nach der Gabe von Silikat könnten also (siehe Dosis-Wirkungs-Kurve, S. 47) durch einen stärkeren Antigenstimulus für das Immunsystem eine stärkere AK-Antwort hervorrufen. Ein ähnlicher Mechanismus dürfte der AK-steigernden Wirkung von Dextransulfat 500 000 (DS 500) zugrunde liegen. DS 500 schädigt die Phagozytosefunktion von Makrophagen

(68) und bewirkt bei der i.p.-Verabreichung eine stärkere Vermehrung von HSV in den inneren Organen und eine gesteigerte Mortalität nach i.p.-Infektionen mit HSV-1 (54). Der Substanz wird allerdings auch die Fähigkeit zugeschrieben, bei der Induktion einer Immunantwort gegen T-abhängige Antigene die Funktion der T-Zellen zu ersetzen (38,206). Auch nach der Immunisierung mit einer Formalin-inaktivierten HSV-Vakzine konnte durch Gaben von Silikat eine Steigerung der AK-Spiegel erzielt werden. Eine stärkere Replikation von HSV, wie sie in den ersten Tagen p.i. nachgewiesen wurde, ist also keine notwendige Voraussetzung für die Wirkung von Silikat. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, daß nach einer Zerstörung der Makrophagen u.U. weniger antigenes Material abgebaut wird und so mehr Antigen zur Stimulation von T- und B-Lymphozyten durch andere zur Präsentation befähigte Zellen zur Verfügung stehen könnte. Weiterhin konnten wir zeigen, daß Silikat noch wirksam war, wenn es zu einem Zeitpunkt gegeben wurde, an dem kein infektiöses Virus mehr in den inneren Organen nachweisbar war (4. bis 12. Tag p.i.). Eine andere Erklärung wäre deshalb, daß die Zerstörung der Makrophagen bestimmte Suppressorwirkungen beseitigt. Hierfür spricht, daß wir in den Kulturüberständen residenter Peritonealmakrophagen eine Aktivität nachweisen konnten, die in vivo die AK-Spiegel reduzierte. Eine suppressorische Aktivität von Makrophagen ist anhand verschiedener Modelle demonstriert worden (3,15,22,53,97,239), wobei sowohl lösliche Proteine wie z.B. Komplementfaktoren und Interferon, als auch Prostaglandine und Wasserstoffperoxyd als Mediatoren der Suppression beschrieben wurden (61,131,132). In der Tat ließ sich demonstrieren, daß eine Behandlung HSV-1-infizierter Mäuse mit dem Cyclooxygenase-Hemmstoff Indometacin eine Steigerung der AK-Spiegel zur Folge hatte. Die HSV-Vermehrung in vitro wird durch Prostaglandin E_2 und F_2 gefördert; Indometacin hat entsprechend eine inhibitorische Wirkung (70). Hierbei könnte eine Rolle spielen, daß PGE_2 die Wirkung von Interferon auf Fibroblasten reduziert (240). Eine immunmodulatorische Funktion kommt den von Makrophagen sezernierten Prostaglandinen insofern zu, als sie die Lymphokinsekretion durch Antigen-aktivierte Lymphozyten hemmen (62).

Eine Reihe von Substanzen (Antiandrogene, Silikat, DS 500, Indometacin) besitzt also offenbar einen modulierenden Einfluß auf die HSV-AK-Antwort. Das zum Vergleich mituntersuchte klassische Freundsche Adjuvans (sowohl IFA als auch CFA) bewirkte eine Steigerung der HSV-AK-Spiegel bei einer Immunisierung mit Formalin-inaktiviertem Virus. Die Antikörperbildung nach der Gabe von infektiösem HSV-1 wurde nicht beeinflusst. Die Wirkung des Freundschen Adjuvans wird dadurch erklärt, daß kleine Tröpfchen der Wasser-in-Öl-Emulsion, wie sie das Antigenlösung-Adjuvans-Gemisch darstellt, im Organismus disseminieren und einerseits vielerorts zur Entstehung chronisch-entzündlicher Reaktionen führen, sowie andererseits das Antigen über einen langen Zeitraum langsam aus der Depotform freisetzen (50).

Makrophagen und verschiedene ihrer Sekretionsprodukte beeinflussen, wie gezeigt werden konnte, deutlich die Bildung der Antikörper im Rahmen von HSV-Infektionen. Von den für den Verlauf von Virusinfektionen bedeutsamen Mediatoren sollte nun noch das Interferon hinsichtlich einer Wirkung auf die AK-Antwort bei HSV-1-infizierten Mäusen untersucht werden.

4. Der Einfluß von Interferoninduktoren und von Natural-Killer-Zellen auf die HSV-Antikörper-Titer

Interferone besitzen neben ihren antiviralen Wirkungen immunmodulatorische Einflüsse verschiedener Art. Hier wurden sowohl die Beeinflussung zellulärer als auch humoraler Immunmechanismen beschrieben (56,238). Die Synthese und die Sekretion von Interferonen wird durch verschiedene Stimuli induziert, beispielsweise durch Viren, durch künstliche Polynucleotide und durch verschiedene Chemikalien (76,238). Unter den künstlichen Polynucleotiden hat sich Poly-I:C (Poly-Inosinsäure-poly-Cytidylsäure) als besonders potenter Interferoninduktor erwiesen, dessen Wirksamkeit durch Komplexbildung des Moleküls mit

einem Kolloid aus Poly-L-Lysin und Carboxymethylzellulose (Poly-I:C(LC)) noch gesteigert werden konnte (27,127,231). Poly-I:C wirkt auch als B-Zell-Stimulator (206).

Bezüglich der in vivo Antikörperbildung gegen HSV-1 konnte gezeigt werden, daß Poly-I:C(LC) - vor der Infektion verabfolgt - eine Verminderung der AK-Spiegel bewirkte, während eine Gabe der Wirksubstanz zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion eine Steigerung der AK-Titer hervorrief. Ein analoges Verhalten ist für den Einfluß von IFN auf die in-vitro-AK-Antwort humaner Lymphozyten auf Pokeweed-Mitogen (PWM) (72) und für die Plaque-forming-cell-Antwort gegen Schafserythrozyten (SRBC) in vivo mit IFN behandelter Mäuse (91) beschrieben worden. Auch hier bewirkte die Gabe von Interferon vor der Immunisierung eine Reduktion, die Verabreichung nach der Immunisierung hingegen eine Steigerung der AK-Spiegel bzw. der PFC-Antwort. Die sehr deutliche Reduktion der HSV-Antikörper durch eine Gabe von Poly-I:C(LC) vor der Infektion kann wohl teilweise dadurch erklärt werden, daß infolge der induzierten IFN-Spiegel die HSV-Vermehrung gehemmt wird und die Antigenmenge somit vermindert wird. Es wurde durch eine Titration der Seren Poly-I:C(LC)-behandelter Mäuse gezeigt, daß die von uns üblicherweise verabreichten Dosen des Polynucleotids tatsächlich hohe IFN-Spiegel induzierten. Eine therapeutische Beeinflussung experimenteller HSV-Infektionen mit Poly-I:C(LC) scheint möglich (127), wenn die Substanz in den ersten Tagen p.i. mehrfach täglich verabfolgt wird. Die behandelten Tiere bilden neutralisierende Antikörper und überleben Zweitinfektionen. Prophylaktisch behandelte Tiere haben keine meßbaren Antikörper und sterben bei Zweitinfektionen.

Seit langem ist bekannt, daß Präparationen bestimmter Propionobakterien, z.B. *Corynebakterium parvum* oder *C. acnes* einen aktivierenden Einfluß auf die Zellen des retikuloendothelialen Systems ausüben (59,69). Man nimmt an, daß die protektive Wirkung einer Vorbehandlung von Mäusen mit *C. parvum* bezüglich der Letalität von HSV-Infektionen durch IFN vermittelt wird. (144,151). Wir konnten zeigen, daß analog den Wirkungen

einer Vorbehandlung mit dem IFN-Induktor Poly-I:C(LC) auch durch eine Vorbehandlung mit *C. parvum* die AK-Titer gegen HSV stark vermindert ausfielen.

Natural-Killer-Zellen sind eine Population mononukleärer Zellen, die in vitro sowohl Tumorzellen als auch virusinfizierte Zellen lysieren können. Diese Lyse ist antigenunspezifisch, nicht durch Histokompatibilitätsantigene restringiert und kann spontan ohne vorangehende Sensibilisierung der Effektoren erfolgen (96,163,245). Den NK-Zellen fehlen die typischen Oberflächenmarker von T- und B-Lymphozyten, sie sind nicht adhärent und nicht phagozytierend, besitzen jedoch Fc-Rezeptoren. Der Umstand, daß die Aktivität von NK-Zellen durch Interferon deutlich gesteigert wird, hat zu der Annahme geführt, daß sie für die Bewältigung von Virusinfektionen von Bedeutung sein könnten, was zumindest im Hinblick auf HSV-Infektionen aber umstritten ist (7,122,147). Ein Fehlen der Natural-Killer-Aktivität mononukleärer Zellen zeichnet die "beige" (bg)-Mutante einiger Mäusestämme aus, die außerdem ein dem Chédiak-Higashi-Syndrom äquivalentes Krankheitsbild mit einer Degranulationsstörung phagozytosefähiger Zellen zur Folge hat (110,195,196). HSV vermehrt sich in vitro besser in den Peritonealmakrophagen von Beige-Mäusen als in denen NK-kompetenter Tiere (63). Die Spiegel spezifischer, neutralisierender Antikörper nach einer primären HSV-1-Infektion waren bei den weiblichen Beige-Mäusen höher und bei den männlichen Beige-Mäusen niedriger als bei ihren NK-intakten Artgenossen. Die NK-Aktivität soll bei den männlichen Mäusen stärker ausgeprägt sein als bei den Weibchen (163). Möglicherweise spiegelt das Ergebnis der AK-Bestimmungen einen gewissen regulierenden Einfluß von NK-Zellen auf die AK-Bildung wider.

Die bisher beschriebenen Versuche befaßten sich mit den Wirkungen von unspezifischen Einflüssen auf die Immunantwort. Bei der Initiation und der Regulation von Immunantworten spielen vor allem antigenspezifische Zellen eine bedeutende Rolle. Die Immunantwort gegen viele komplexe Antigene, so auch gegen HSV, kommt nur unter einer Mitwirkung von T-Helferzellen zu-

stande (T-Zell-abhängige Antigene) (20). Es sollten deshalb noch einige Aspekte der Wirkungen von T-Zellen auf die AK-Antwort gegen HSV bearbeitet werden. Hierzu wurde HSV-infizierten Mäusen in vivo unter verschiedenen Bedingungen das T-Zell-Mitogen Bestatin verabreicht.

5. Der Einfluß von Bestatin auf die Antikörperbildung

Bestatin [(2S,3R)-3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl]-L-Leucin wird aus Kulturfiltraten von *Streptomyces olivoreticuli* isoliert. Zunächst erkannte man die kompetitive Hemmwirkung des Peptids auf die Aktivität der Zelloberflächen-assoziierten Aminopeptidase B und der Leucin-Aminopeptidase. Später wurde die Fähigkeit der Substanz zur Aktivierung von T-Lymphozyten entdeckt (86,152).

Eine in-vivo-Verabreichung von Bestatin bewirkt bei Mäusen eine Proliferation der T-Lymphozyten in der Milz, im Thymus und im Knochenmark (87,152). Entsprechend werden erhöhte Aktivitäten der DNA-Polymerase α und der terminalen Desoxyribonucleotidyltransferase in den T-Lymphozyten gemessen (152). Etwa 15 Stunden nach einer i.p.-Gabe von Bestatin erreicht die Steigerung des Thymidin-Einbaus ihr Maximum (152). In vitro erfolgt eine Steigerung des DNA-Metabolismus der T-Lymphozyten nur bei Anwesenheit von Makrophagen in der Kultur (86). Man nimmt deshalb an, daß Makrophagen die mitogene Wirkung von Bestatin vermitteln, was durch den Befund gestützt wird, daß Bestatin in Milzzellkulturen die Freisetzung von Interleukin 1 (und auch von Interleukin 2) anregt (88). Tatsächlich besitzen Makrophagen die höchste Zahl an Bindungsstellen für Bestatin (ca. $1,5 \times 10^7$ /Zelle), während die Dichte dieser "Rezeptoren" bei T-Lymphozyten ($2,5 \times 10^6$) und bei B-Lymphozyten (9×10^5) wesentlich niedriger ist (153). Die Bindungsfähigkeit der Zellen für Bestatin ist am stärksten in der Periode des Übergangs von der S-Phase zur G_2 -Phase. Als Interaktionspartner für

Bestatin wird die Zelloberflächen-assoziierte Leucin-Amino-peptidase angesehen, deren Aktivitätsverteilung mit der Bindungsfähigkeit der Zellen für Bestatin parallel geht; außerdem kann die Bindung von Bestatin durch Leucinderivate gehemmt werden (115,153). Die Wirkungen von Bestatin auf T-Zell-abhängige Immunreaktionen sind dosisabhängig. In vitro wird der Thymidineinbau in T-Lymphozyten durch Bestatin-Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 1 µg/ml gesteigert; Konzentrationen von mehr als 10 µg/ml erhöhen die Anzahl der AK-bildenden Zellen gegen Schafse erythrozyten (86,207). Die in-vivo-Schwellendosis von Bestatin zur Steigerung der T-Zell-Proliferation beträgt etwa 10 µg/Maus (ca. 500 µg/kg) (87,152). Eine Verstärkung der DTH-Antwort gegen Schafse erythrozyten erfolgt im Bereich zwischen 1 µg und 100 µg pro Maus (87). In verschiedenen Systemen wurde eine immunologische Anti-Tumor-Aktivität durch Bestatin induziert oder verstärkt (85,87). Es existieren Hinweise, daß diese Fähigkeit von Bestatin in einer Aktivierung von Makrophagen zur Tumor-Zytotoxizität bestehen könnte (215).

Unsere Untersuchungen zum Einfluß von Bestatin auf die Bildung neutralisierender Antikörper bei HSV-Infektionen ergaben zunächst, daß die Verabreichung dieses T-Zell-Mitogens in vivo dann eine Steigerung der Titer neutralisierender Antikörper bewirkte, wenn man es zwischen dem 3. und dem 8. Tag p.i. nach einer primären Infektion injizierte, wobei die optimale Wirkung am 5. Tag erzielt wurde. Im Gegensatz dazu lag das Wirkungsoptimum von Bestatin bei sekundären HSV-Infektionen am 1. Tag p.i.

Die mit dem Neutralisationstest gemessene Verstärkung der AK-Antwort könnte einerseits eine Steigerung der AK-Synthese insgesamt bedeuten, andererseits aber auch Ausdruck einer Vermehrung des Anteils neutralisierender AK an den Gesamt-AK sein (190).

Bei Primärkontakt mit einem Antigen bedarf es einer gewissen Zeit, bis eine Immunantwort eine signifikante Effektorleistung erbringt, während bei Sekundärantworten aufgrund des Vorhandenseins von Gedächtniszellen die entsprechenden spezifischen

Effektoren wesentlich schneller zur Verfügung stehen. Die unterschiedlichen Zeitspannen, in denen bei primären und sekundären HSV-Infektionen Bestatin wirksam werden konnte, lassen sich dadurch erklären, daß Bestatin entweder bei beiden Reaktionstypen am gleichen Angriffspunkt des Induktionsapparates wirkt, der bei primären Reaktionen nur später erreicht wird, oder aber daß es an unterschiedlichen Stellen in den Aktivierungsmechanismus der AK-Antwort eingreift. In beiden Fällen muß man davon ausgehen, daß bereits ein bestimmter Aktivierungsgrad des Immunapparates erreicht sein muß, bevor Bestatin verstärkend auf die AK-Synthese wirken kann. Bei der Primärinfektion sind die Antikörpertiter der mit Bestatin behandelten Tiere während der ersten 10 Tage p.i. immer etwas höher als die der Kontrolltiere, jedoch wird ein signifikanter Bestatin-Effekt erst nach dem Einsetzen der IgG-Bildung (etwa ab dem 12. Tag p.i.) meßbar. Daher könnte man vermuten, daß ein Angriffspunkt von Bestatin im Bereich derjenigen Mechanismen liegt, welche den Übergang von der IgM- zur IgG-Bildung bewirken. Andererseits ist es möglich, daß physiologischerweise bestimmte Suppressionsmechanismen in der Frühphase einer HSV-Infektion auftreten, welche die Bildung meßbarer AK-Spiegel überhaupt vor dem 5. Tag p.i. verhindern und hierbei auch den Angriffszeitraum für Bestatin hinauszögern. Diese Überlegung wird dadurch unterstützt, daß bei Mäusen, die mit Silikat vorbehandelt wurden, Bestatin bereits am 1. Tag p.i. voll wirksam war. Hieraus könnte man folgern, daß die erwähnten Suppressionswirkungen von Makrophagen - den Akzeptorzellen des Silikats - ausgehen, oder aber, daß die Freisetzung von Speicherprodukten der Makrophagen (wie IFN oder Il-1) das Erreichen einer für Bestatin sensiblen Phase des Antikörper-bildenden Apparates beschleunigt.

Zur Prüfung der Frage, inwieweit die beobachteten Zeitabhängigkeiten der Wirkungen von Silikat und von Bestatin durch die Vermehrung des HSV in der Maus beeinflusst werden, immunisierten wir mit einer Formalin-inaktivierten HSV-1-Vakzine. Die Wirkungen von Silikat und Bestatin bei Mäusen, die mit

Formalin-inaktivierter HSV-Vakzine immunisiert worden waren, entsprachen den beim infektiösen Virus beobachteten. Es kann deshalb angenommen werden, daß die verzögerte Ansprechbarkeit des AK-bildenden Apparates für Bestatin nicht Ausdruck einer Schädigung der beteiligten Zellen durch das infektiöse Virus ist.

Die Bedeutung der Sekretionsprodukte von Makrophagen für die Wirksamkeit von Bestatin wird noch durch unsere Befunde bezüglich der in vivo für Bestatin sensibilisierenden Eigenschaften von Makrophagen-Kulturüberständen unterstrichen. Wir konnten hier zeigen, daß der Kulturüberstand von Makrophagen, welche einen Tag nach der Infektion mit HSV-1 gewonnen worden waren, bei der in-vivo-Verabreichung (2 h p.i.) bewirkte, daß die Injektion von Bestatin bereits am 1. Tag nach der Infektion eine Steigerung der HSV-Antikörper ermöglichen konnte. Kulturen von Makrophagen, die 3 oder 5 Tage nach einer in-vivo-Infektion mit HSV etabliert wurden, produzierten keine derartige Aktivität. Ein Faktor, der den AK-bildenden Apparat für Bestatin "sensibilisiert", wird also offenbar recht früh nach einer HSV-Infektion gebildet. Es wurde darüber hinaus demonstriert, daß die Verabfolgung des IFN-Induktors Poly-I:C(LC) ebenfalls eine frühzeitige Wirksamkeit von Bestatin ermöglichte. Somit erscheint der Schluß gerechtfertigt, daß IFN die Permissivität des Immunapparates für die Wirkung von Bestatin fördert. Dabei könnte u.U. von Bedeutung sein, daß IFN die Expression von Ia-Antigenen auf Makrophagen verstärkt (56). Bestatin selbst induzierte keine Interferon-Aktivität.

Gewisse Suppressorwirkungen der Makrophagen könnten aber auch in der Sekretion von Prostaglandinen bestehen (3,82). In der Tat gelang es, durch eine Verabreichung des Cyclooxygenase-Inhibitors Indometacin wiederum, einen Angriffspunkt für Bestatin zu einem vorgezogenen Zeitpunkt zu schaffen. Auch hier kann eine Beeinflussung der Ia-Expression der Makrophagen diskutiert werden: Prostaglandine (besonders die der E-Klasse) reduzieren den Anteil Ia-positiver Makrophagen deutlich (227). Die Befunde bezüglich der Wirkungen von Poly-I:C(LC) und von Indometacin

legen die Vermutung nahe, daß Bestatin vornehmlich über Ia-positive Makrophagen die Stimulation von T-Lymphozyten bewirkt.

Eine Bestätigung der Annahme, daß die Steigerung der HSV-AK-Spiegel durch Bestatin über die beschriebene Stimulation von T-Lymphozyten erfolgt, ergab sich aus Versuchen, in denen die Verabreichung von Bestatin mit der Gabe von Cyclosporin A kombiniert wurde. Bei Cyclosporin A handelt es sich um ein aus Pilzkulturen isoliertes Peptid (16), welches T-Zell-abhängige zelluläre und humorale Immunmechanismen blockieren kann (100). Cyclosporin A wirkt auf T-Lymphozyten in frühen Differenzierungsstadien; seine Wirkung auf B-Lymphozyten ist sehr gering. Primäre Immunantworten werden durch diese Substanz stark gehemmt, wenn sie zum Zeitpunkt der Immunisierung verabfolgt wird. Sekundärantworten werden kaum beeinflusst. Cyclosporin A soll auf der Ebene der T-Inducer-Zellen wirken, welche die Freisetzung von Il-1 aus Makrophagen kontrolliert (19), oder aber die Expression von Il-2-Rezeptoren modulieren (100). Die kombinierte Verabreichung von Bestatin und Cyclosporin A hatte zur Folge, daß die von Bestatin zu diesem Zeitpunkt erwartete Steigerung der HSV-AK-Spiegel ausblieb.

Die AK-steigernde Wirkung von Bestatin am 5. Tag p.i. war von der verabfolgten Dosis abhängig. Wir konnten zwei Dosisbereiche feststellen (1 ng/kg bis 100 ng/kg und ≥ 10 µg/kg), in deren erstem eine deutlich nachweisbare und in deren zweitem eine sehr starke Steigerung der HSV-AK-Spiegel bewirkt wurde. Der Kurvenverlauf läßt für beide Dosisbereiche offenbar auf einen Alles-oder-Nichts-Effekt schließen. Wie erwähnt, sind zur Stimulation des Thymidin-Einbaus von T-Lymphozyten in vivo Dosen von mehr als 500 µg/kg (Maus) erforderlich (87,152). Bezüglich der AK-Bildung erfolgt somit zumindest im ersten Dosisbereich die Wirkung von Bestatin in Abwesenheit einer verstärkten T-Zell-Proliferation.

Das Bestatin-Enantiomer Epibestatin erwies sich wie Bestatin als Stimulator der HSV-AK-Bildung. Epibestatin besitzt jedoch

keine inhibitorische Wirkung auf die Leucin-Aminopeptidase (115), die als Rezeptor für Bestatin auf der Zelloberfläche angesehen wird. Dieser Befund wirft die Frage auf, ob es neben einem durch den Aminopeptidase-Rezeptor-vermittelten noch einen anderen Wirkungsmechanismus für Bestatin geben könnte.

Zur Klärung der Frage, inwieweit die beschriebene Wirkung von Bestatin für die primäre HSV-1-Infektion spezifisch war, wurde verglichen, welchen Effekt Bestatin bei der AK-Bildung gegen SRBC hatte. Es zeigte sich, daß Bestatin in diesem Modell kaum wirksam war, und daß die Wirkung am ersten und am 5. Tag p.i. etwa gleiches Ausmaß hatte. Offenbar handelte es sich bei den für die HSV-1-Infektion beschriebenen Befunden, besonders bezüglich der Zeitabhängigkeit einer Gabe von Bestatin, um Phänomene, welche die Eigentümlichkeiten der Interaktionen des jeweiligen Antigens mit dem Immunsystem widerspiegeln, und somit von Größen wie der Dosis, der Replikationsfähigkeit und dem Inokulationsort abhängig sind.

Trotz der deutlichen Steigerung der Serumspiegel neutralisierender Antikörper hatte Bestatin keinen Einfluß auf den Verlauf der primären HSV-1-Infektionen. Dieser Umstand ist dadurch zu erklären, daß der schnelle starke Anstieg der AK-Titer nach einer Verabreichung von Bestatin erst nach dem 12. Tag p.i. einsetzt. Die für die HSV-Clearance verantwortlichen Mechanismen werden dagegen bereits an den ersten Tagen nach der Infektion wirksam, konnten aber auch durch eine sehr frühe Gabe von Bestatin nicht beeinflußt werden.

Eine Behandlung HSV-infizierter Mäuse mit dem T-Zell-Mitogen Bestatin bewirkte eine Steigerung der Titer neutralisierender Antikörper. Bei den für diese Wirkung verantwortlichen Zellen dürfte es sich um T-Helfer-Zellen handeln, welche die Aktivität der HSV-spezifischen B-Lymphozyten dann verstärken.

Das Ausmaß einer Immunantwort wird bestimmt vom Verhältnis verstärkender und hemmender Impulse der immunregulatorischen Zellen. Neben den eben beschriebenen Suppressoraktivitäten der Makrophagen können auch von einer Subpopulation der T-

Lymphozyten, den T-Suppressorzellen, zügelnde Einflüsse ausgehen. Es sollte nun also noch geprüft werden, ob die AK-Bildung gegen HSV-1 einer Beeinflussung durch T-Suppressorzellen unterliegt.

6. Die Wirkung von Cyclophosphamid auf die HSV-Antikörper-Spiegel

Ein Zustand vorübergehender Hyporeagibilität des Immunsystems wird in der Frühphase vieler Virusinfektionen beobachtet. Als Ursache kommt einerseits eine direkte Infektion und Schädigung immunkompetenter Zellen in Betracht, andererseits wurde die Induktion komplexer Suppressionsmechanismen durch verschiedene Virusinfektionen beschrieben (23,154,249). HSV-Infektionen können mit verschiedenen spezifischen und unspezifischen immunsuppressiven Aktivitäten assoziiert sein (4,23,159,180, 181,216). Von besonderem Interesse ist hier die Beobachtung, daß spontane Herpes-Rezidive bei Meerschweinchen begleitet sind vom Auftreten HSV-spezifischer Suppressorzellen (89). Andere Autoren berichten auch von Suppressormechanismen, die in vivo die Entwicklung von HSV-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten kontrollieren und deren Nachweis in vitro verhindern. Eine Kultivierung der Effektorzellen über drei Tage, oder aber die Verabreichung von Cyclophosphamid beseitigen eine derartige Suppression (182,183,200). Makrophagen sind gegenüber Cyclophosphamid relativ unempfindlich (123). Man nimmt an, daß Cyclophosphamid in niedriger Dosis vorwiegend auf T-Suppressorzellen wirkt (200,235).

Die Spiegel neutralisierender HSV-Antikörper wurden durch Cyclophosphamid in Abhängigkeit vom Zeitpunkt und der verabfolgten Dosis unterschiedlich beeinflusst. Wurde die Substanz vor oder kurz nach der Infektion injiziert, so resultierte in jedem Fall eine Steigerung der AK-Titer. In diesem Zeitraum steigert Cyclophosphamid die Letalität von HSV-Infektionen

deutlich (98,187,250); die Virusclearance aus den viszerale Organen ist verzögert (187). Man kann also annehmen, daß ein verstärkter Antigenstimulus Hauptursache der erhöhten AK-Spiegel ist. Zu späteren Zeitpunkten p.i., wenn kein infektiöses Virus mehr im Organismus nachweisbar ist, bewirkten hohe Dosen Cyclophosphamid eine Senkung der AK-Spiegel (zytostatisch-immunsuppressiver Effekt), während niedrige Dosen eine deutliche Steigerung der Titer zur Folge hatten (reduzierte T-Suppressor-Wirkung). Aufgrund der Überlagerung mit dem "Virusvermehrungseffekt" kann der genauere Zeitpunkt, an dem die Suppressorwirkung auf die AK-Bildung beginnt, nicht festgestellt werden. Hingegen konnte demonstriert werden, daß die Cyclophosphamid-empfindlichen Zügelmechanismen für längere Zeit wirksam blieben.

7. Synoptische Betrachtung der Ergebnisse

Nach einer primären i.p.-Infektion mit 3×10^3 PFU HSV-1 (Len) konnte während der ersten drei Tage p.i. infektiöses Virus aus verschiedenen viszerale Organen der Maus isoliert werden. Neutralisierende Antikörper waren ab dem 5. Tag p.i. nachweisbar. Die AK-Bildung gegen HSV-1 unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen. Inhibitorische Wirkungen gehen offenbar einerseits von T-Suppressorzellen (Cyclophosphamid-sensibel) aus, andererseits scheinen Makrophagen (Silikat-sensibel) unter anderem durch Prostaglandine (Indometacin-sensibel) einen zügelnden Einfluß auf die AK-Produktion auszuüben. Die Wirkungen von Interferon (induziert durch Poly-I:C) entsprachen den im SRBC-System (56,91) beobachteten: Die HSV-AK-Spiegel wurden vermindert, wenn es vor der Infektion verabreicht wurde bzw. gesteigert, wenn es nach einer Infektion zur Wirkung kam. Der T-Zell-Stimulator Bestatin wirkte interessanterweise nur in einem sehr umschriebenen Zeitraum, vom 3. bis zum 8. Tag p.i. (mit Optimum am 5. Tag p.i.) verstärkend auf die AK-Bildung. Diese verzögert einsetzende Wirkungs-

zeitspanne für Bestatin (bei der AK-Bildung gegen SRBC wirkt es früher) könnte durch das vorübergehende Fehlen einer für Bestatin sensibilisierenden Aktivität oder aber durch die Existenz von inhibitorischen Wirkungen erklärt werden. Tatsächlich gelang es, durch eine Verabfolgung von Interferon-induktoren oder von Cyclooxygenase-Hemmstoffen eine Sensibilität für Bestatin zu einem früheren Zeitpunkt herbeizuführen. Prostaglandine zögern also offenbar den Angriffszeitpunkt von Bestatin hinaus, während er unter der Einwirkung von Interferon früher erreicht wird; möglicherweise spielt hierbei eine Einflußnahme der Substanzen auf die Ia-Expression von Makrophagen (56,227) eine Rolle. Kürzlich wurde demonstriert, daß Bestatin in Kulturen von Milzzellen die Freisetzung von Interleukin 1 und von Interleukin 2 stimuliert (88), die auch für die Initiation humoraler Immunantworten erforderlich sind. Der Umstand, daß Bestatin eine Steigerung der HSV-AK-Synthese erst einige Tage nach der Infektion auslösen kann, konnte dafür sprechen, daß entweder entsprechende Interleukinrezeptoren nicht früher auf den für HSV-Antigene kompetenten Lymphozyten exprimiert werden, daß die oben erwähnten Suppressor-mechanismen eine frühere Sekretion zumindest eines der Interleukine verhindern und so potentielle humorale Mediatoren der Bestatinwirkung ausschalten oder aber, daß die HSV-Antigenpräsentation durch die entsprechenden präsentierenden Zellen nur verzögert erfolgt.

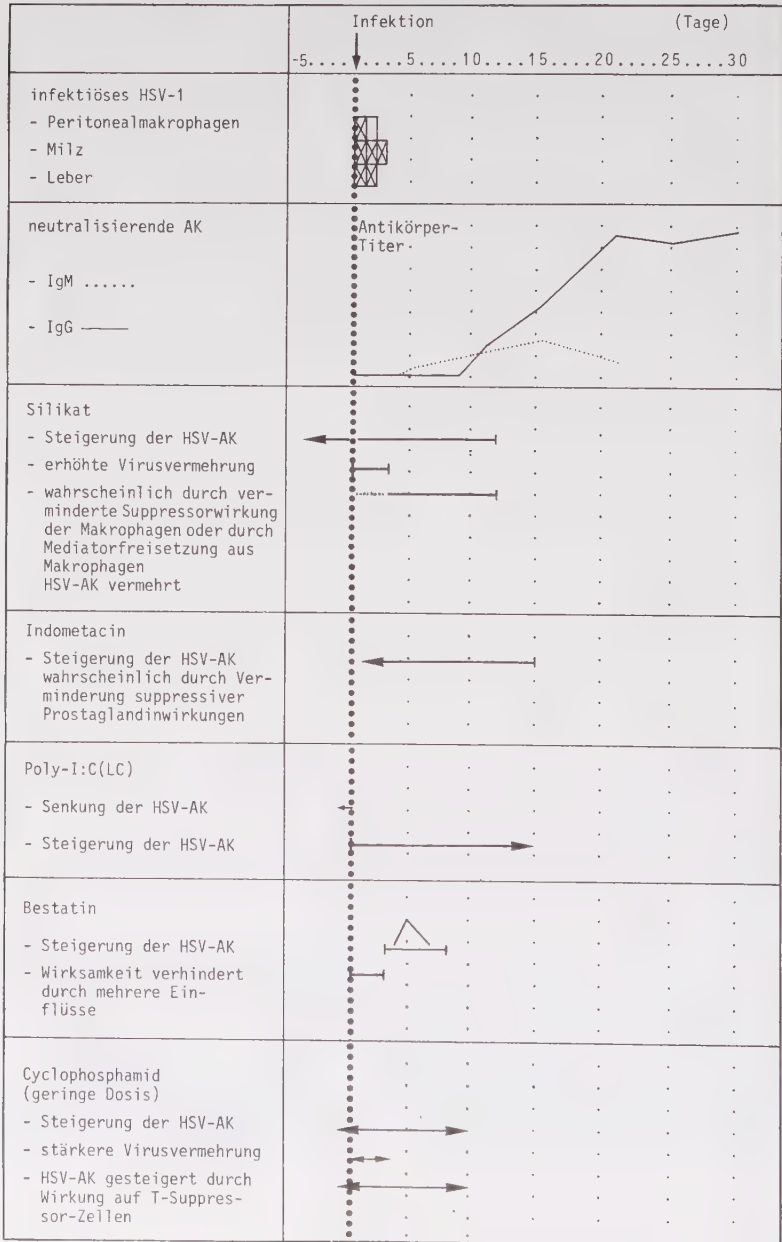
Die hier dargestellten Versuche haben sich mit Wirkung unterschiedlicher Einflußgrößen auf die humorale Immunantwort bei primären HSV-1-Infektionen der Maus befaßt. Durch den Einsatz mehrerer immunmodulatorischer Substanzen konnten verschiedene Regelmechanismen der AK-Bildung nach einer HSV-Infektion in vivo beeinflußt werden.

Eine Reihe von Fragen konnte innerhalb des komplexen Systems, welches ein in-vivo-Modell zwangsläufig darstellt, nicht beantwortet werden. Es war hier dann nur möglich, verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für die beobachteten Phänomene anzubieten, deren Klärung durch Einsatz verschiedener in-vitro-Systeme über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen wäre.

Synoptische Darstellung der Ergebnisse verschiedener Versuche

(Die Wirkung einer Substanz ließ sich von/bis zu einem bestimmten Zeitpunkt ab/an nachweisen: — bzw. —.)

(Die Wirkung einer Substanz wurde von/bis zu einem gewissen Zeitpunkt ab/an untersucht: ← bzw. →.)



E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Parameter mit Einfluß auf das Ausmaß der HSV-1-spezifischen Antikörperbildung bei primär mit dem HSV infizierten Mäusen untersucht.

Neutralisierende Antikörper waren vom 5. Tag p.i. an zunächst in geringen Mengen nachweisbar. Vom 10. Tag p.i. an stiegen die AK-Spiegel schnell auf hohe Werte an und erreichten am 20. Tag p.i. ein Plateau. Die Höhe der AK-Titer 21 Tage p.i. war abhängig von der Höhe des Virusinokulums und vom Inokulationsort. Darüber hinaus war ein Einfluß der Pathogenität des zur Infektion verwendeten HSV-Stammes zu erkennen.

Ein klar definierbarer Einfluß auf das Ausmaß der HSV-spezifischen AK-Bildung konnte weder für bestimmte Transplantationsgene (H-2-Haplotypen) noch für das Background-Genom nachgewiesen werden. Hingegen zeigten weibliche Mäuse - unabhängig von den vorgenannten Faktoren - stets höhere AK-Titer als ihre männlichen Artgenossen. Der supprimierende Einfluß androgener Sexualsteroid auf die AK-Spiegel nach HSV-Infektionen wurde durch Kastrationsversuche und durch die Verabreichung von Antiandrogenen (Cyproteron) demonstriert.

Nach einer Applikation von Silikat stiegen die Titer der neutralisierenden Antikörper bei den HSV-infizierten Mäusen deutlich an, wenn Silikat an einem Zeitpunkt zwischen vier Tagen a.i. und 12 Tagen p.i. verabreicht wurde. Silikat findet in vitro und in vivo Verwendung zur Zerstörung von Makrophagen. Die Behandlung HSV-infizierter Mäuse mit Silikat bewirkte eine stärkere Vermehrung des Virus in den viszerale Organen; die Viruselimination erfolgte jedoch gleich schnell wie bei unbehandelten infizierten Kontrolltieren. Sicher hat die verstärkte Vermehrung von HSV einen Einfluß auf die erhöhten AK-Spiegel, jedoch bewirkt Silikat auch eine Anhebung der AK-Pegel nach einer Immunisierung mit einer Formalin-inaktivierten HSV-Vakzine. In den Kulturüberständen residenter Peritonealmakrophagen wurde eine Aktivität nachgewiesen, die bei einer

Reinjektion der Überstände in HSV-infizierte Mäuse die AK-Bildung verminderte. Durch eine Behandlung HSV-infizierter Mäuse mit dem Prostaglandin-Synthese-Hemmer Indometacin oder mit dem Phagozytose-Blocker Dextransulfat 500 000 konnten die HSV-AK-Spiegel angehoben werden. Mäuse, die vor einer HSV-1-Infektion mit dem Interferon-Induktor Poly-I:C(LC) behandelt worden waren, produzierten weniger neutralisierende Antikörper als die Tiere der Kontrollgruppe. Wurde nach einer HSV-1-Infektion der Interferon-Induktor verabreicht, resultierte eine signifikante Steigerung der AK-Pegel.

Der Einfluß von T-Lymphozyten auf die humorale Immunantwort gegen das T-Zell-abhängige Antigen HSV-1 wurde durch eine Verabfolgung des T-Lymphozyten-Mitogens Bestatin untersucht. Eine signifikante Anhebung der Spiegel neutralisierender Antikörper nach einer primären i.p.-Infektion mit dem HSV-1 gelang durch eine Verabreichung von Bestatin zwischen dem 5. und dem 8. Tag p.i.; die deutlichste Wirkung der Substanz wurde am 5. Tag p.i. beobachtet. Die Wirksamkeit von Bestatin am 5. Tag p.i. war dosisabhängig; die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigte einen zweigipfligen Verlauf. Eine Verabfolgung von Bestatin am 5. Tag p.i. wirkte sich ab dem 15. Tag p.i. meßbar auf die Titer der neutralisierenden Antikörper aus. Bei einer sekundären HSV-Infektion konnte die höchste Steigerung der AK-Pegel bereits am Tag nach der Zweitinfektion erzielt werden. Eine Vorbehandlung der Mäuse mit Silikat gestattete bereits am ersten Tag nach einer Primärinfektion eine Anhebung der AK-Titer durch die Verabreichung von Bestatin. Es war möglich, durch eine Injektion der Kulturüberstände von Peritonealmakrophagen einen dieser Wirkung von Silikat analogen Effekt zu erzielen; die entsprechende Aktivität war in Kulturen von Makrophagen vorhanden, welche entweder am ersten Tag nach einer in-vivo-HSV-Infektion oder am Tag nach einer in-vivo-Verabreichung von Silikat gewonnen worden waren. Eine Behandlung der Mäuse mit dem Prostaglandin-Synthese-Hemmstoff Indometacin oder dem Interferon-Induktor Poly-I:C(LC) ermöglichte ebenfalls am ersten Tag nach einer Primärinfektion eine Anhebung der AK-Pegel durch eine Verab-

reichung von Bestatin. Durch Bestatin selbst wurde keine Interferon-Synthese in der Maus induziert. Die Steigerung der AK-Spiegel durch Bestatin konnte durch eine gleichzeitige Verabfolgung des T-Lymphozyten-spezifischen Immunsuppressivums Cyclosporin A unterdrückt werden. Die Behandlung der Mäuse mit Bestatin hatte keinen Einfluß auf die Elimination des HSV aus den viszerale Organen oder auf die Letalität nach einer Infektion mit einer höheren Dosis von HSV. Ein Vergleich der Wirksamkeit von Silikat und Bestatin auf die AK-Bildung bei der primären HSV-Infektion mit der Wirksamkeit nach der Immunisierung von Mäusen mit Schafserythrozyten ergab deutliche Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes und der Zeitabhängigkeit des jeweiligen Effekts. Dagegen war kein grundsätzlicher Unterschied der Wirkungen dieser Substanzen nach der Verabfolgung von infektiösem HSV bzw. nach der Immunisierung mit einer inaktivierten Vakzine zu verzeichnen.

Cyclophosphamid, welches in niedriger Dosis Suppressorzell-Aktivitäten hemmt, bewirkte eine Erhöhung der AK-Titer zu verschiedenen Zeitpunkten nach der HSV-Infektion.

Die Ergebnisse wurden diskutiert unter den Aspekten des Einflusses virusspezifischer Parameter und der Rolle verschiedener immunologischer Mechanismen in Bezug auf die HSV-spezifische AK-Bildung. Bei den letztgenannten standen die Wirkungen der Makrophagen und der T-Lymphozyten und ihre Beeinflussbarkeit durch immunmodulatorische Agentien im Vordergrund.

F. Abkürzungen

ADCC	- Antikörper-vermittelte, zelluläre Zytotoxizität
a.i.	- ante infectionem, vor der Infektion
AK	- Antikörper
C3	- 3. Komplementkomponente
CFA	- komplettes Freundsches Adjuvans
C. acnes	- Corynebacterium acnes
C. parvum	- Corynebacterium parvum
CTL	- zytotoxische T-Lymphozyten
DNA	- Desoxyribonucleinsäure
DS 500	- Dextransulfat 500 000
DTH	- delayed type hypersensitivity, Reaktion vom verzögerten Typ
FA	- Freundsches Adjuvans
g	- Erdbeschleunigung
HSV	- Herpes simplex Virus
Ia	- H-2I-Region assoziiertes Antigen, von Immunantwort-(Ir-)Genen kontrolliert
IFA	- inkomplettes Freundsches Adjuvans
IFN	- Interferon
Ig	- Immunglobulin
Il-1	- Interleukin 1
Il-2	- Interleukin 2
i.m.	- intramuskulär
i.p.	- intraperitoneal
i.plant.	- in die Fußsohle
KG	- Körpergewicht
KÜ	- Kulturüberstand
Lyt	- Differenzierungs-Antigen von T-Lymphozyten
MØ	- Makrophage
NK	- Natural-Killer
NT	- Neutralisationstest
OD	- optische Dichte
P	- statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
P _{>}	- Prozentsatz nicht-neutralisierter Virus- partikel > 50 %
P _{<}	- Prozentsatz nicht-neutralisierter Virus- partikel < 50 %

PEC	- Peritonealexsudat-Zellen
PFC	- plaque-forming cell, AK-produzierende Zelle
PFU	- plaque-forming unit, infektiöses Teilchen
p.i.	- post infectionem, nach der Infektion
Poly-I:C	- poly-Inositidyl-poly-Cytidyl-Säure
m-RNA	- messenger-Ribonucleinsäure
RR	- Rollrand-Röhrchen
r.W.	- reziproke Werte
s.c.	- subcutan
SRBC	- Schafserythrozyten
Vf	- Verdünnungsfaktor
V _{>}	- Serumverdünnung, durch welche mehr als 50 % des eingesetzten Virus neutralisiert wird
V _{<}	- Serumverdünnung, durch welche weniger als 50 % des eingesetzten Virus neutralisiert wird
VP	- Veronalpuffer
VSV	- Vesicular Stomatitis Virus
ZNS	- Zentralnervensystem

6. Literaturverzeichnis

1. Adam, E.:
Herpes simplex virus infections.
In: Human Herpesvirus Infections - Clinical Aspects.
R. Glaser, T. Gotlieb-Stematsky (eds.), S. 1
M. Dekker, New York, 1982
2. Allison, A.C., Harington, J.S. and M. Birbeck:
An examination of the cytotoxic effects of silica on
macrophages.
J. Exp. Med. 124: 141 (1966)
3. Allison, A.C.:
Mechanisms by which activated macrophages inhibit
lymphocyte responses.
Immunol. Rev. 40: 3 (1978)
4. Altmann, D.A. and W.A. Blyth:
Suppressor cells for delayed type hypersensitivity to
HSV-1 induced by lipopolysaccharide: Nature of suppres-
sor cell and effect on pathogenesis of HSV. S. 91
8th International Herpesvirus Workshop, Oxford, 1983
5. Andervont, H.B.:
Activity of herpetic virus in mice.
J. Exp. Med. 48: 383 (1929)
6. Andonov, P., Dundarov, S., Bakalov, B., Tomov, S.,
Zenov, N. and R. Todorova:
The effect of killed anti-herpes vaccines.
In: International Congress of Infectious and Parasitic
Diseases. S. 538
Varna, Bulgarien, 1978
7. Amerding, D.:
Studies on the interrelation of resistance and immunity
in a mouse model system of Herpes-simplex type 2 infection.
Immunobiology 161: 415 (1982)
8. Armstrong, J.A., Skicki-Mullen, M.B., Breinig, M.K. and
Monto Ho:
Interferon susceptibility of Herpes simplex virus strains
isolated from patients enrolled in clinical trials.
Antimicrob. Agents Chemother. 24: 137 (1983)
9. Ashe, W.K. and A.L. Notkins:
Neutralization of an infectious Herpes simplex virus-
antibody complex by anti- γ -globulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 447 (1966)

10. Baker, D.A. and S.A. Plotkin:
Enhancement of vaginal infection in mice by Herpes simplex type II with progesterone (40156).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 158: 131 (1978)
11. Balachandran, N., Bachetti, S. and W.E. Rawls:
Protection against lethal challenge of BALB/c mice by passive transfer of monoclonal antibodies to five glycoproteins of Herpes simplex virus type 2.
Infect. Immun. 37: 1132 (1982)
12. Baron, S., Worthington, M.G., Williams, J. and J.W. Gaines:
Postexposure serum prophylaxis of neonatal Herpes simplex virus infections of mice.
Nature 261: 505 (1976)
13. Beck, S., Slater, D. and C.I. Harrington:
Fatal chronic cutaneous Herpes simplex associated with thymoma and hypogammaglobulinaemia.
Br. J. Dermatol. 105: 471 (1981)
14. Blyth, W.A., Harbour, D.A. and T.J. Hill:
Effect of immunosuppression on recurrent Herpes simplex in mice.
Infect. Immun. 29: 902 (1980)
15. Boraschi, D. and J.E. Niederhuber:
Regulation of macrophage suppression and cytotoxicity by interferon: Role of Ia-bearing macrophages.
J. Immunol. 129: 1854 (1982)
16. Borel, J.F., Feurer, C., Magnée, C. and H. Stähelin:
Effects of the new anti-lymphocyte peptide cyclosporin A in animals.
Immunology 32: 1017 (1977)
17. Brier, A.M., Wohlenberg, C., Rosenthal, J., Mage, M. and A.N. Notkins:
Inhibition or enhancement of immunological injury of virus-infected cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 3073 (1971)
18. Bruns, H.:
Electron microscopic studies of Herpes simplex virus type 1 infection of macrophages, T- and B-lymphocytes of mice.
Arch. virol. 64: 257 (1980)
19. Bunjes, D., Hardt, C., Röllinghoff, M. and H. Wagner:
Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2.
Eur. J. Immunol. 11: 657 (1981)

20. Burns, W.H., Billups, L.C. and A.L. Notkins:
Thymus dependence of viral antigens.
Nature 256: 654 (1975)
21. DuBuy, H.:
Effect of silica on virus infections in mice and mouse
tissue culture.
Infect. Immun. 11: 996 (1975)
22. Calderon, J., Williams, R.T. and E.R. Unanue:
An inhibitor of cell proliferation released by cultures
of macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 4273 (1974)
23. Cappel, R., Henry, C. and L. Thiry:
Experimental immunosuppression induced by Herpes simplex
virus.
Arch. virol. 49: 67 (1975)
24. Carter, V.C., Rice, P.L. and S.S. Tevethia:
Intratyptic and intertypic specificity of lymphocytes
involved in the recognition of Herpes simplex virus
glycoproteins.
Infect. Immun. 37: 116 (1982)
25. Caspary, L., Schindling, B., Dundarov, S. and D. Falke:
Infections of susceptible and resistant mouse strains
with Herpes simplex virus type 1 and 2.
Arch. virol. 65: 219 (1980)
26. Cesario, T., Goldstein, A., Lindsey, M., Dumars, K. and
J. Tilles:
Antiviral activities of amniotic fluid.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 168: 403 (1981)
27. Champney, K.J., Levine, D.P., Levy, H.B. and A.M. Lerner:
Modified polyriboinosinic-polyribocytidylic acid complex:
Sustained interferonaemia and its physiological asso-
ciates in humans.
Infect. Immun. 25: 831 (1979)
28. Chan, W.L.:
Protective immunization of mice with specific HSV-1
glycoproteins against lethal challenge. S. 259
8th International Herpesvirus Workshop, Oxford, 1983
29. Ching, C. and C. Lopez:
Natural killing of Herpes simplex virus type 1-infected
target cells: Normal human responses and influence of
antiviral antibody.
Infect. Immun. 26: 49 (1979)

30. Cohen, G.H., Dietzschold, B., Ponce de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varrichio, A., Pereira, L. and R.J. Eisenberg:
Localization and synthesis of an antigenic determinant of Herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody.
J. Virol. 49: 102 (1984)
31. Cohn, D.A.:
High sensitivity to androgen as a contributing factor in sex differences in the immune response.
Arthritis Rheum. 22: 1218 (1979)
32. Collier, L.H., Scott, Q.J. and A. Pani:
Variation in resistance of cells from inbred strains of mice to Herpes simplex virus type 1.
J. Gen. Virol. 64: 1483 (1983)
33. Cook, M.L. and J.G. Stevens:
Restricted replication of Herpes simplex virus in spinal ganglia of resistant mice its accompanied by an early infiltration of immunoglobulin G-bearing cells.
Infect. Immun. 40: 752 (1983)
34. Cooper, N.R. and R.M. Welsh jr.:
Antibody and complement-dependent viral neutralization.
Springer Semin. Immunopathol. 2: 285 (1979)
35. Daniels, C.A., Borsos, T., Rapp, H.J., Snyderman, R. and A.L. Notkins:
Neutralization of sensitized virus by purified components of complement.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65: 528 (1970)
36. Davis, W.B., Taylor, J.A. and J.E. Oakes:
Ocular infection with Herpes simplex virus type 1: Prevention of acute herpetic encephalitis by systemic administration of virus-specific antibody.
J. Inf. Dis. 140: 534 (1979)
37. Della-Porta, A.J. and E.G. Westaway:
A multi-hit model for the neutralization of animal viruses.
J. Gen. Virol. 38: 1 (1978)
38. Diamantstein, T., Wagner, B., L'Age-Stehr, J., Beyse, I., Odenwald, M.V. and G. Schultz:
Stimulation of humoral antibody formation of polyanions. III. Restoration of the immune response to sheep red blood cells by polyanions in thymectomized and lethally irradiated mice protected with bone marrow cells.
Eur. J. Immunol. 1: 302 (1971)
39. Dimmock, N.J.:
Mechanisms of neutralization of animal viruses.
J. Gen. Virol. 65: 1015 (1984)

40. Dix, R.D., Pereira, L. and R. Baringer:
Use of monoclonal antibody directed against Herpes simplex virus glycoproteins to protect mice against acute virus-induced neurological disease.
Infect. Immun. 34: 192 (1981)
41. Domke, I., Brücher, J., Schröder, C.H. and H. Kirchner:
The role of interferon in the in vitro replication of Herpes simplex virus (HSV) type 1 in mouse macrophages.
8th International Herpesvirus Workshop; S. 257
Oxford, 1983
42. Dulbecco, R.:
Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of animal virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38: 747 (1952)
43. Eberle, R. and R.J. Courtney:
gA and gB glycoproteins of Herpes simplex virus type 1: Two forms of a single polypeptide.
J. Virol. 36: 665 (1980)
44. Eberle, R. and R.J. Courtney:
Assay of type-specific and type-common antibodies to Herpes simplex virus types 1 and 2 in human sera.
Infect. Immun. 31: 1062 (1981)
45. Eberle, R., Russell, R.G. and B.T. Rouse:
Cell-mediated immunity to Herpes simplex virus: Recognition of type-specific and type-common surface antigens by cytotoxic T cell populations.
Infect. Immun. 34: 795 (1981)
46. Eberle, R. and Sido-Wen Mou:
Relative titers of antibodies to individual polypeptide antigens of Herpes simplex virus type 1 in human sera.
J. Inf. Dis. 148: 436 (1983)
47. Edstroem, S., Vahlne, A., Arstila, P., Beran, M., Ejnell, H., Nylen, O. and E. Lycke:
Bell's palsy and Herpes simplex virus.
Arch. Otolaryngol. 107: 79 (1981)
48. Eidinger, D. and T.J. Garrett:
Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation.
J. Exp. Med. 136: 1098 (1972)
49. Eisen, H.N.:
The cellular basis for immune responses.
In: Microbiology. Ch. 18, S. 381
B.D. Davies, R. Dulbecco, H.N. Eisen and H.S. Ginsberg (eds)
Harper and Row, Hagerstown, MD, USA, 1980

50. Eisen, H.N.:
Antibody formation.
In: Microbiology. Ch. 19, S. 420
B.D. Davies, R. Dulbecco, H.N. Eisen and H.S. Ginsberg (eds.)
Harper and Row, Hagerstown, MD, USA, 1980
51. Ennis, F.A.:
Host defense mechanisms against Herpes simplex virus.
I. Control of infection in vitro by sensitized spleen
cells and antibody.
Infect. Immun. 7: 898 (1973)
52. Falke, D.:
Untersuchungen über die Beziehung zwischen Riesenzell-
bildung und Infektiosität von Herpes simplex Virus.
Arch. ges. Virusforsch. 15: 387 (1965)
53. Fernandez, L.A. and J.M. MacSween:
The suppressive effects of monocytes in the autologous
mixed lymphocyte reaction.
Immunology 44: 653 (1981)
54. Frank, U., Caspary, L., Hahn, H. and D. Falke:
The effect of dextran sulfate 500 on the pathogenesis of
Herpes simplex virus infections in weanling mice.
Arch. Virol. 58: 259 (1978)
55. Friedman, H.M., Cohen, G., Eisenberg, R., Seidel, C.
and D. Cines:
Glycoprotein C HSV-1 functions as a receptor for the
complement component C3b.
8th International Herpesvirus Workshop. S. 306
Oxford, 1983
56. Friedman, R.M. and S.N. Vogel:
Interferons with special emphasis on the immune system
Adv. Immunol. 34: 97 (1983)
57. Galloway, D.A. and J.K. McDougall:
The Oncogenic potential of Herpes simplex viruses:
Evidence for a 'hit and run' mechanism.
Nature 302: 21 (1983)
58. Gerdes, J.C. and D.S. Smith:
Recurrence phenotypes and establishment of latency
following rabbit keratitis produced by multiple Herpes
simplex virus strains.
J. Gen. Virol. 64: 2441 (1983)
59. Glasgow, L.A., Fischbach, J., Bryant, S.M. and E.R. Kern:
Immunomodulation of host resistance to experimental
viral infections of mice: Effects of Corynebact. acnes,
Corynebact. parv. and Bacille Calmette-Guérin.
J. Inf. Dis. 135: 763 (1977)

60. Glorioso, J., Kees, U., Kümel, G., Kirchner, H. and P.H. Krammer:
Limiting dilution analysis of the specificity of cytotoxic T-lymphocytes for Herpes simplex virus glycoprotein determinants. S. 83
8th International Herpesvirus Workshop,
Oxford, 1983
61. Goodwin, J.S., Messner, R.P. and G.T. Peake:
Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro.
J. Clin. Invest. 62: 753 (1978)
62. Gordon, D., Bray, M.A. and J. Morley:
Control of lymphokine secretion by prostaglandins.
Nature 262: 401 (1976)
63. Görtz, J., Brake, B., Härle-Grupp, V. and D. Falke:
Replication of HSV-1 in murine peritoneal macrophages: Comparison of various virus strains with different properties.
Arch. Virol. 79: 173 (1984)
64. Gresser, I., Tovey, M.G., Maury, C. and M.T. Bandu:
Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum.
J. Exp. Med. 144: 1316 (1976)
65. Grewal, A.S., Rouse, B.T. and L.A. Babiuk:
Mechanisms of resistance to Herpesviruses: Comparison of the effectiveness of different cell types in mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.
Infect. Immun. 15: 698 (1977)
66. Grewal, A.S., Rouse, B.T. and L.A. Babiuk:
Mechanisms of recovery from viral infections: Destruction of infected cells by neutrophils and complement.
J. Immunol. 124: 312 (1980)
67. Grodums, E.I. and A. Zbitnew:
Experimental Herpes simplex virus carditis in mice.
Infect. Immun. 14: 1322 (1976)
68. Hahn, H.:
Mechanismen der zellulären Abwehrleistung bei Infektionen. Untersuchungen an der experimentellen Listeriose.
Habilitationsschrift, Mainz 1973
69. Halpern, B., Prevot, A.R., Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D., Morard, J.C., Bouthilier, Y., C. Decreusefond:
Stimulation de l'activité phagocytaire du système reticulo-endothelial provoqué par *Corynebact. parvum*.
J. Reticuloendothel. Soc. 1:77 (1964)

70. Harbour, D.A., Blyth, W.A. and T.J. Hill:
Prostaglandins enhance spread of Herpes simplex virus.
J. Gen. Virol. 41: 87 (1978)
71. Harbour, D.A., Hill, T.J. and W.A. Blyth:
Recurrent Herpes simplex in the mouse: Inflammation in
the skin and activation of virus in the ganglia follow-
ing peripheral stimulation.
J. Gen. Virol. 64: 1491 (1983)
72. Härfast, B., Huddleston, J.R., Casali, P., Merigan, T.C.,
and M.A. Oldstone:
Interferon acts directly on human B lymphocytes to
modulate immunoglobulin synthesis.
J. Immunol. 127: 2146 (1981)
73. Harrison, R.G.:
The cultivation of tissues in extraneous media as a method
of morphologic study.
Anat. Rec. 6: 181 (1912)
74. Hayashi, Y., Wada, T. and R. Mori:
Protection of newborn mice against Herpes simplex virus
infection by prenatal and postnatal transmission of
antibody.
J. Gen. Virol. 64: 1007 (1983)
75. Heineman, H.S.:
Herpes simplex neutralizing antibody - Quantitation of
the complement-dependent fraction in different phases
of adult human infection.
J. Immunol. 99: 214 (1967)
76. Hilleman, M.R.:
Prospects for the use of double-stranded ribonucleic
acid (poly I:C) inducers in man.
J. Inf. Dis. 121: 196 (1970)
77. Hirsch, M.S., Zisman, B. and A.C. Allison:
Macrophages and age-dependent resistance to Herpes
simplex virus in mice.
J. Immunol. 104: 1160 (1970)
78. Hochman, N., Roness, Y., Ehrlich, J., Levy, R. and
Z. Zakay-Rones:
Antibodies to Herpes simplex virus in human gingival
fluid.
J. Periodontol. 52: 324 (1981)
79. Hoffmann, L.G. and M.M. Mayer:
Immune hemolysis and complement fixation.
In: Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. IV,
S. 137; C.A. Williams and M.W. Chase (eds.)
Academic Press, New York, 1977

80. Howes, E.L., Taylor, W., Mitchison, N.A. and E.Simpson:
MHC matching shows that at least two T-cell subsets
determine resistance to HSV. \
Nature 277: 67 (1979)
81. Howie, S. and W.H. McBride:
Cellular interactions in thymus-dependent antibody
responses.
Immunology Today 3: 273 (1982)
82. Humes, J.L., Bonney, R.J., Pelus, L., Dahlgren, M.E.,
Sadowski, S.J., Kuehl, F.A., jr., and P. Davies:
Macrophages synthesize and release prostaglandins in
response to inflammatory stimuli.
Nature 269: 149 (1977)
83. Imanishi, J., Matsubara, M. and K. Tsunataro:
Comparative studies on the inhibitory effects of inter-
feron on various strains of Herpes simplex viruses
in vitro.
Biken J. 23: 107 (1980)
84. International Committee on Taxonomy of Viruses:
4th Report of the International Committee on Taxonomy
of Viruses.
Intervirology 17: 47 (1982)
85. Ishizuka, M., Masuda, T., Kanbayashi, N., Fukasawa, S.,
Takeuchi, T., Aoyagi, T. and H. Umezawa:
Effect of bestatin on mouse immune system and experi-
mental murine tumors.
J. Antibiotics 33: 642 (1980)
86. Ishizuka, M., Sato, J., Sugiyama, Y., Takeuchi, T. and
H. Umezawa:
Mitogenic effect of bestatin on lymphocytes.
J. Antibiotics 33: 653 (1980)
87. Ishizuka, M., Aoyagi, T., Takeuchi, T. and H. Umezawa:
Activity of bestatin: Enhancement of immune responses
and antitumor effect.
In: Small Molecular Immunomodifiers of Microbial Origin.
Fundamental and Clinical Studies of Bestatin. S. 17
H. Umezawa (ed.)
Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1981
88. Ishizuka, M. and H. Umezawa:
Effect of Bestatin on Experimental Animal Tumors.
Proceedings of the XIII. International Congress on
Chemotherapy, Wien, 1983, 204/3 - 204/8
89. Iwasaka, T. Sheridan, J.F. and L. Aurelian:
Immunity to Herpes simplex virus type 2: Recurrent
lesions are associated with the induction of suppressor
cells and soluble suppressor factors.
Infect. Immun. 42: 955 (1983)

90. Jennings, S.R., Rice, P.L. and S. Tevethia:
Recognition of Herpes simplex virus antigens on the
surface of H-2b murine cells by cytotoxic T lymphocytes.
8th International Herpesvirus Workshop; S. 84
Oxford, 1983
91. Johnson, H.M.:
Effect of interferon on antibody formation.
Tex. Rep. Biol. Med. 35: 357 (1977)
92. Kaerner, H.C., Schröder, Ch., Ott-Hartmann, A., Kümel, G.
and H. Kirchner:
Genetic variability of HSV: Development of a pathogenic
variant during passaging of a non-pathogenic HSV-1 virus
strain in mouse brain.
J. Virol. 46: 83 (1983)
93. Kalimo, K.O.K., Joronen, I.A. and V.K. Havu:
Cell-mediated immunity against Herpes simplex virus
envelope, capsid, excreted, and crude antigens.
Infect. Immun. 39: 24 (1983)
94. Kapoor, A.K., Nash, A.A. and P. Wildy:
Pathogenesis of Herpes simplex virus in B cell-suppressed
mice: the relative roles of cell-mediated and humoral
immunity.
J. Gen. Virol. 61: 127 (1982)
95. Katz, D.H.:
The immune system: An overview.
In: Basic & Clinical Immunology; D.P. Stites, J.D. Stobo,
H.H. Fudenberg and J.V. Wells (eds.), S. 13
Lange, Los Altos, C ., 1982
96. Kiessling, R., Klein, E. and H. Wigzell:
"Natural" killer cells in the mouse:
I. Cytotoxic cells with specificity for mouse moloney
leukaemia cells. Specificity and distribution according
to genotype.
Eur. J. Immunol. 5: 112 (1975)
97. Kirchner, H., Holden, H.T. and R.B. Herberman:
Splenic suppressor macrophages induced in mice by
injection of *Corynebacterium parvum*.
J. Immunol. 115: 1212 (1975)
98. Kirchner, H., Kochen, M., Hirt, H.M. and K. Munk:
Immunological studies of HSV-infection of resistant and
susceptible inbred strains of mice.
Z. Immun.-Forsch. 154: 147 (1978)
99. Kirchner, H.:
Immunobiology of infection with Herpes simplex virus.
Monographs in Virology (J.B. Melnick, ed.) 13: 7 (1982)

100. Klaus, G.G.B.:
The effects of cyclosporin A on the immune system.
Immunology today 1: 83 (1981)
101. Klein, J.:
The major histocompatibility complex of the mouse.
Science 203: 516 (1979)
102. Klein, R.J.:
Effect of immune serum on the establishment of Herpes
simplex virus infection in trigeminal ganglia of hair-
less mice.
J. Gen. Virol. 49: 401 (1980)
103. Klein, R.J.:
The pathogenesis of acute, latent and recurrent Herpes
simplex virus infections. Brief review.
Arch. Virol. 72: 143 (1982)
104. Kohl, S., Loo, L.S. and L.K. Pickering:
Protection of neonatal mice against Herpes simplex virus
infection by human antibody and leukocytes from adult,
but not neonatal humans.
J. Immunol. 127: 1273 (1981)
105. Kohl, S.:
Human immune response to Herpes simplex virus.
J. Inf. Dis. 146: 292 (1982)
106. Koyama, H. and S. Kasahara:
Induction of Herpes simplex virus immunity in newborn
mice.
Infect. Immun. 12: 1472 (1975)
107. Krzych, U., Strausser, H.R., Bressler, J.P. and A.L.
Goldstein:
Quantitative differences in immune responses during
various stages of the estrous cycle in female BALB/c
mice.
J. Immunol. 121: 1603 (1978)
108. Kümel, G., Kirchner, H., Schröder, C.H. and H.C. Kaerner:
Peripheral infection of mice with HSV: Lethal and non-
lethal genetic virus variants.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 251: 433 (1982)
109. Lahita, R.G.:
Effects of sex hormones, nutrition, & aging on the
immune response.
In: Basic & Clinical Immunology. S. 293
D.P. Stites, J.D. Stobo, H.H. Fudenberg and J.V. Wells
(eds.),
Lange, Los Altos, C., 1982

110. Lane, P.W. and E.D. Murphy:
Susceptibility to spontaneous pneumonitis in an inbred strain of beige and satin mice.
Genetics 72: 451 (1972)
111. Lascano, E.F. and M.I. Berria:
Histological study on the progression of Herpes simplex virus in mice.
Arch. Virol. 64: 67 (1980)
112. Lawman, M.J.P., Courtney, R.J., Eberle, R., Schaffer, P.A., O'Hara, M.K. and B.T. Rouse:
Cell-mediated immunity to Herpes simplex virus: Specificity of cytotoxic T cells.
Infect. Immun. 30: 451 (1980)
113. Lawman, M.J.P., Rouse, B.T., Courtney, R.J. and R.D. Walker:
Cell-mediated immunity against Herpes simplex: Induction of cytotoxic T lymphocytes.
Infect. Immun. 27: 133 (1980)
114. Lawman, M.J.P., Naylor, P.T., Huang, L., Courtney, R.J. and B.T. Rouse:
Cell-mediated immunity to Herpes simplex virus: Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by viral antigens incorporated into liposomes.
J. Immunol. 126: 304 (1981)
115. Leyhausen, G., Schuster, D.K., Vaith, P., Zahn, R.K., Umezawa, H., Falke, D. and W.E.G. Müller:
Identification and properties of the cell membrane bound leucine aminopeptidase interacting with the potential immunostimulant and chemotherapeutic agent bestatin.
Biochem. Pharmac. 32: 1051 (1983)
116. Lodmell, D.L., Niwa, A., Hayasen, K. and A.L. Notkins:
Prevention of cell-to-cell spread of Herpes simplex by leukocytes.
J. Exp. Med. 137: 706 (1973)
117. Lodmell, D.L. and A.L. Notkins:
Cellular immunity to Herpes simplex virus mediated by interferon.
J. Exp. Med. 140: 764 (1974)
118. Lopez, C.:
Genetics of natural resistance to Herpesviruses in mice.
Nature 258: 152 (1975)
119. Lopez, C. and M. Bennett:
Genetic resistance to HSV-1 in the mouse is mediated by a marrow (M)-dependent cell. S. 82
Fourth International Congress of Virology,
Den Haag, 1978

120. Lopez, C. and G. Dudas:
Replication of Herpes simplex virus type 1 in macrophages from resistant and susceptible mice.
Infect. Immun. 23: 432 (1979)
121. Lopez, C.:
Resistance to HSV-1 in the mouse is governed by two major, independently segregating, non-H-2 loci.
Immunogenetics 11: 87 (1980)
122. Lopez, C., Ryshke, R. and M. Bennett:
Marrow-dependent cells depleted by ⁸⁹Sr mediate genetic resistance to Herpes simplex virus type 1 infection in mice.
Infect. Immun. 28: 1028 (1980)
123. Makinodan, T., Santos, G.W. and R.P. Quinn:
Immunosuppressive drugs.
Pharmacological Reviews 22: 189 (1970)
124. Mandell, B.:
Interactions of viruses with neutralizing antibodies.
In: Virus-Host-Interactions - Immunity to Viruses (Comprehensive Virology Vol. 15); S. 37;
H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner (eds.)
Plenum Press, New York 1979
125. Mann, D.M., Yates, P.Q., Davies, J.S. and J. Hawkes:
Viruses parkinsonism and Alzheimer's disease.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 44: 651 (1981)
126. Mann, D.R. and M.D. Hilty:
Antibody response to Herpes simplex 1 polypeptides and glycoproteins in primary and recurrent infection.
Pediatr. Res. 16: 176 (1982)
127. Martinez, D., Lynch, R.J., Meeker, J.B. and A.K. Field:
Macrophage dependence of polyribonucleosinic acid - polyribocytidylic acid - induced resistance to Herpes simplex virus infection in mice.
Infect. Immun. 28: 147 (1980)
128. McGeorge, M. and P.S. Morahan:
Comparison of various macrophage-inhibitory agents on vaginal and systemic Herpes simplex virus type 2 infections.
Infect. Immun. 22: 623 (1978)
129. McKendall, R.R., Klassen, T. and J.R. Baringer:
Host defenses in Herpes simplex infections of the nervous system: Effect of antibody on disease and viral spread.
Infect. Immun. 23: 305 (1979)

130. Melewicz, F.M., Shore, S.L., Ades, E.W. and D.J. Phillips:
The mononuclear cell in human blood which mediates
antibody-dependent cellular cytotoxicity to virus-in-
fected target cells: II. Identification as a K cell.
J. Immunol. 118: 567 (1977)
131. Metcalfe, D.D. and M. Kaliner:
The role of prostaglandins in allergic inflammation.
In: Cellular Functions in Immunity and Inflammation. S. 355
J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich and M. Potter (eds.)
E. Arnold, London, 1981
132. Metzger, Z., Hoffeld, J.T. and J.J. Oppenheim:
Macrophage-mediated suppression.
I. Evidence for participation of both hydrogen peroxide
and prostaglandins in suppression of murine lymphocyte
proliferation.
J. Immunol. 124: 983 (1980)
133. Mogensen, S.C., Teisner, B. and H.K. Andersen:
Focal necrotic hepatitis as a biological marker for
differentiation of Herpesvirus hominis type 1 and type 2.
J. Gen. Virol. 25: 151 (1974)
134. Mogensen, S.C.:
Biological conditions influencing the focal necrotizing
hepatitis test for differentiation between Herpes simplex
virus types 1 and 2.
Acta path. Microbiol. Scand. Sect. B 84: 154 (1976)
135. Mogensen, S.C.:
Role of macrophages in hepatitis induced by Herpes simplex
virus types 1 and 2 in mice.
Infect. Immun. 15: 686 (1977)
136. Mogensen, S.C.:
Genetics of macrophage-controlled resistance to hepatitis
induced by Herpes simplex type 2 in mice.
Infect. Immun. 17: 268 (1977)
137. Mogensen, S.C. and H.K. Andersen:
Effect of silica on the pathogenic distinction between
Herpes simplex virus type 1 and 2 in mice.
Infect. Immun. 17: 274 (1977)
138. Mogensen, S.C.:
Macrophages and age-dependent resistance to hepatitis
induced by Herpes simplex virus type 2 in mice.
Infect. Immun. 19: 46 (1978)
139. Mogensen, S.C. and H.K. Andersen:
Role of activated macrophages in resistance of congeni-
tally athymic nude mice to hepatitis induced by Herpes
simplex virus type 2.
Infect. Immun. 19: 792 (1978)

140. Mogensen, S.C. and H.K. Andersen:
Recovery of mice from Herpes simplex virus type 2
hepatitis: Adoptive transfer of recovery with immune
spleen cells.
Infect. Immun. 33: 743 (1981)
141. Møller-Larsen, A., Heron, I. and S. Haahr:
Cell-mediated cytotoxicity to Herpes-infected cells in
humans: Dependence on antibodies.
Infect. Immun. 16: 43 (1977)
142. Morahan, P.S., Breinig, M.C. and M.B. McGeorge:
Immune responses to vaginal or systemic infection of
BALB/c mice with Herpes simplex virus type 2.
J. Immunol. 119: 2030 (1977)
143. Morahan, P.S., Glasgow, L.A., Crane, J.L. and E.R. Kern:
Comparison of antiviral and antitumor activity of
activated macrophages.
Cell. Immunol. 28: 404 (1977)
144. Morahan, P.S., Kern, E.R. and L.A. Glasgow:
Immunomodulator-induced resistance against Herpes simplex
virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154: 615 (1977)
145. Morahan, P.S. and S.S. Morse:
Macrophage - virus interactions.
In: Virus-Lymphocyte Interactions: Implications for
Disease. S. 17; M. Proffitt (ed.)
Elsevier North Holland, New York, 1979
146. Morahan, P.S., Morse, S.S. and M.B. McGeorge:
Macrophage extrinsic antiviral activity during Herpes
simplex virus infection.
J. Gen. Virol. 46: 291 (1980)
147. Morahan, P.S., Coleman, P.H., Morse, S.S. and A. Volkman:
Resistance factors in beige (Chédiak-Higashi) mice and
89-Sr-treated mice.
Fifth International Congress of Virology, Straßburg 1981,
S. 152 (W 11/12)
148. Morahan, P.S., Thomson, T.A., Kohl, S. and B.K. Murray:
Immune responses to labial infection of BALB/c mice
with Herpes simplex virus type 1.
Infect. Immun. 32: 180 (1981)
149. Morton, J.I., Weyant, D.A., Siegel, B.V. and B. Golding:
Androgen sensitivity and autoimmune disease.
I. Influence of sex and testosterone on the humoral
immune response of autoimmune and non-autoimmune mouse
strains to sheep erythrocytes.
Immunology 44: 661 (1981)

150. Moser, H., Behrens, F., Ziegelmaier, R., Hilfenhaus, J. and R. Mauler:
Correlation of Herpes simplex virus antibody titers and specific lymphocyte stimulation in adult blood donors.
J. Clin. Mikrobiol. 13: 36 (1981)
151. Müllbacher, A.:
Herpesvirus immunity. The many means of host protection.
Immunology today 4: 308 (1983)
152. Müller, W.E.G., Zahn, R.K., Arendes, J., Munsch, N. and H. Umezawa:
Activation of DNA metabolism in T-cells by bestatin.
Biochem. Pharmacol. 28: 3131 (1979)
153. Müller, W.E.G., Schuster, D.K., Zahn, R.K., Maidhof, A., Leyhausen, G., Falke, D., Koren, R. and H. Umezawa:
Properties and specificity of binding sites for the immunomodulator bestatin on the surface of mammalian cells.
Int. J. Immunopharmac. 4: 393 (1982)
154. Munk, K., Kirchner, H., Reiser, H. and R. Braun:
Infection of human T-lymphocytes with Herpes simplex virus (HSV): Restriction to a specific T-cell subset and evidence for receptor structures on the cell surface.
8th International Herpesvirus Workshop,
Oxford, 1983, S. 82
155. Nagafuchi, S., Oda, H., Mori, R. and T. Taniguchi:
Mechanism of acquired resistance to Herpes simplex virus infection as studied in nude mice.
J. Gen. Virol. 44: 715 (1979)
156. Nahmias, A.J. and B. Roizman:
Infection with Herpes simplex viruses 1 and 2.
N. Engl. J. Med. 289: 667,719,781 (1973)
157. Nahmias, A.J. and B. Norrild:
Oncogenic potential of Herpes simplex viruses and their association with cervical neoplasia.
In: Oncogenic Herpesviruses. Vol. II, S. 25; F.Rapp (ed.)
CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1980
158. Nash, A.A., Field, H.J. and R. Quarley-Papafio:
Cell-mediated immunity in Herpes simplex virus-infected mice: Induction, characterization and antiviral effects of delayed type hypersensitivity.
J. Gen. Virol. 48: 351 (1980)
159. Nash, A.A. and P.H.G. Gell:
Cell-mediated immunity in Herpes simplex virus-infected mice: Suppression of delayed hypersensitivity by an antigen-specific B lymphocyte.
J. Gen. Virol. 48: 359 (1980)

160. Nash, A.A., Quartey-Papafio, R. and P. Wildy:
Cell-mediated immunity in Herpes simplex virus-infected mice: Functional analysis of lymph node cells during periods of acute and latent infection, with reference to cytotoxic and memory cells.
J. Gen. Virol. 49: 309 (1980)
161. Nash, A.A., Phelan, J. and P. Wildy:
Cell-mediated immunity in Herpes simplex virus-infected mice: H-2 mapping of the delayed-type hypersensitivity response and the antiviral T cell response.
J. Immunol. 126: 1260 (1981)
162. Naylor, P.T., Larsen, H.S., Huang, L. and B.T. Rouse:
In vivo induction of anti-Herpes simplex virus immune response by type 1 antigens and lipid A incorporated into liposomes.
Infect. Immun. 36: 1209 (1982)
163. Nelson, D.L.:
Cell-mediated cytotoxicity.
In: Cellular Functions in Immunity and Inflammation. S. 187
J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich and M. Potter (eds.)
E. Arnold, London, 1981
164. Neumann, F.:
Chemie, Biochemie und pharmakologische Grundlagen der Antiandrogene.
Deutsches Ärzteblatt 75: 1633/1691 (1978)
165. Nicola, N.A. and M. Vadas:
Hemopoietic colony stimulating factors.
Immunology today 5: 76 (1984)
166. Norrild, B., Shore, S.L. and A.J. Nahmias:
Herpes simplex virus glycoproteins: Participation of individual Herpes simplex virus type 1 glycoprotein antigen in immunocytolysis and their correlation with previously identified glycopolypeptides.
J. Virol. 32: 741 (1979)
167. Norrild, B.:
Immunochemistry of Herpes simplex virus glycoproteins.
Current Topics in Microbiology and Immunology 90: 67 (1980)
168. Norrild, B., Shore, S.L., Cromeans, T.L. and A.J. Nahmias:
Participation of three major glycoprotein antigens of Herpes simplex virus type 1 early in the infectious cycle as determined by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.
Infect. Immun. 28: 38 (1980)
169. Oakes, J.E.:
Role of cell-mediated immunity in the resistance of mice to subcutaneous Herpes simplex virus infection.
Infect. Immun. 12: 166 (1975)

170. Oakes, J.E. and H. Rosemond-Hornbeak:
Antibody-mediated recovery from subcutaneous Herpes
simplex virus type 2 infection.
Infect. Immun. 21: 489 (1978)
171. Oakes, J.E., Davis, W.B., Taylor, J.A. and W.A. Weppner:
Lymphocyte reactivity contributes to protection conferred
by specific antibody passively transferred to Herpes
simplex virus-infected mice.
Infect. Immun. 29: 642 (1980)
172. Oakes, J.E. and R.N. Lausch:
Role of Fc fragments in antibody-mediated recovery from
ocular and subcutaneous Herpes simplex virus infections.
Infect. Immun. 33: 109 (1981)
173. Ohashi, M. and Y. Ozaki:
Studies on the neutralizing antibody to Herpes simplex
virus.
Arch. Virol. 67: 57 (1981)
174. Openshaw, H., Asher, L.V.S., Wohlenberg, C., Seikizawa,
T. and A.L. Notkins:
Acute and latent infection of sensory ganglia with Herpes
simplex virus: Immune control and virus reactivation.
J. Gen. Virol. 44: 205 (1979)
175. Openshaw, H.:
Latency of Herpes simplex virus in ocular tissue of mice.
Infect. Immun. 39: 960 (1983)
176. Ozaki, Y. and T. Ishiguro:
Relationship between type specific antibodies to Herpes
simplex virus and type specificity in human sera.
J. Med. Virol. 12: 103 (1983)
177. Paavonen, T., Andersson, L.C. and H. Adlercreutz:
Sex hormone regulation of the immune response.
J. Exp. Med. 154: 1935 (1981)
178. Paroski, P.A. jr. and S. Read:
Herpes proctitis. Associated findings.
N.Y. State J. Med. 82: 227 (1982)
179. Pedersen, E.B., Haahr, S. and S.C. Mogensen:
X-linked resistance of mice to high doses of Herpes simplex
virus type 2 correlates with early interferon production.
Infect. Immun. 42: 740 (1983)
180. Pelton, B.K., Imrie, R.C. and A.M. Denman:
Susceptibility of human lymphocyte populations to
infection by Herpes simplex virus.
Immunology 32: 803 (1977)

181. Pelton, B.K., Duncan, I.B. and A.M. Denman:
Herpes simplex virus depresses antibody production by
affecting T-cell function.
Nature 284: 176 (1980)
182. Pfizenmaier, K., Jung, H., Starzinski-Powitz, A.,
Röllinghoff, M. and H. Wagner:
The role of T cells in anti-Herpes simplex virus immunity.
I. Induction of antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes.
J. Immunol. 119: 939 (1977)
183. Pfizenmaier, K., Starzinski-Powitz, A., Röllinghoff, M.,
Falke, D. and H. Wagner:
T-cell mediated cytotoxicity against Herpes simplex
virus-infected target cells.
Nature 265: 630 (1977)
184. Phinney, P.R., Fligiel, S., Bryson, Y.J. and D.D. Porter:
Necrotizing vasculitis in a case of disseminated neo-
natal Herpes simplex infection.
Arch. Pathol. Lab. Med. 106: 83 (1982)
185. Price, R.W., Walz, M.A., Wohlenberg, C. and A.L. Notkins:
Latent infection of sensory ganglia with Herpes simplex
virus: Efficacy of immunization.
Science 188: 938 (1975)
186. Price, R.W. and J. Schmitz:
Route of infection, systemic host resistance and integrity
of ganglionic axons influence acute and latent Herpes
simplex virus infection of the superior cervical ganglion.
Infect. Immun. 23: 373 (1979)
187. Rager-Zisman, B. and A.C. Allison:
Mechanism of immunologic resistance to Herpes simplex
virus 1 (HSV-1) infection.
J. Immunol. 116: 35 (1976)
188. Rajčáni, J., Čiampor, F., Sabó, A., Lábiková, H. and
M. Rosenberová:
Activation of latent Herpesvirus hominis in explants of
rabbit trigeminal ganglia: the influence of immune serum.
Arch. Virol. 53: 55 (1977)
189. Ramsey, P.G., Fife, K.H., Hackman, R.C., Meyers, J.D.
and L. Corey:
Herpes simplex virus pneumonia. Clinical, virologic and
pathologic features in 20 patients.
Ann. Intern. Med. 97: 813 (1982)
190. Ratner, J.J. and K.O. Smith:
Serum antibodies to Herpes simplex virus type 1 during
active oral Herpes infections.
Infect. Immun. 27: 113 (1980)

191. Rawls, W.E.:
Herpes simplex virus.
In: The Herpesviruses. S. 293; A.S. Kaplan (ed.)
Academic Press, New York, 1973
192. Reed, L.J. and H. Muench:
A simple method of estimating fifty per cent endpoints.
Am. J. Hyg. 27: 493 (1938)
193. Renis, H.E., Eidson, E.E., Mathews, J. and J.E. Gray:
Pathogenesis of Herpes simplex virus types 1 and 2 in
mice after various routes of inoculation.
Infect. Immun. 14: 571 (1976)
194. Richards, J.T., Kern, E.R., Overall, J.C. jr. and L.A.
Glasgow:
Differences in neurovirulence among isolates of Herpes
simplex virus types 1 and 2 in mice using four routes
of infection.
J. Inf. Dis. 144: 464 (1981)
195. Roder, J.C.:
The beige mutation in the mouse. I. A stem cell predeter-
mined impairment in natural killer cell function.
J. Immunol. 123: 2168 (1979)
196. Roder, J. and A. Duwe:
The beige mutation in the mouse selectively impairs
natural killer cell function.
Nature 278: 451 (1979)
197. Roizman, B. and S.B. Spring:
Alterations in immunologic specificity of cells infected
with cytolytic viruses.
In: Proceedings of the Conference on Cross-Reacting Anti-
gens and Neoantigens. S. 85; J.J. Trentin (ed.)
Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1967
198. Roizman, B. and E.D. Kieff:
Herpes simplex and Epstein-Barr viruses in human cells
and tissues: A study in contrasts.
In: Cancer, Vol. 2, S. 241; F.F. Becker (ed.)
Plenum Publishing Corporation, New York, 1976
199. Rola-Pleszczynski, M.:
In vitro induction of human cell-mediated cytotoxicity
directed against Herpes simplex virus-infected cells:
Characterization of the effector lymphocyte.
J. Immunol. 125: 1475 (1980)
200. Röllinghoff, M., Starzinski-Powitz, A., Pfizenmaier, K.,
and H. Wagner:
Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the
in vivo generation of antigen-specific cytotoxic T lympho-
cytes.
J. Exp. Med. 145: 455 (1977)

201. Rosenberg, G.L. and A.L. Notkins:
Induction of cellular immunity to Herpes simplex virus:
Relationship to the humoral immune response.
J. Immunol. 112: 1019 (1974)
202. Rosenthal, L.J.:
Replication of Herpesviruses and latency.
Can. J. Microbiol. 25: 239 (1979)
203. Rouse, B.T., Grewal, A.S., Babiuk, L.A. and Y. Fujimiya:
Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cyto-
toxicity of Herpesvirus-infected cells by complement.
Infect. Immun. 18: 660 (1977)
204. Rouse, B.T. and M.P. Lawman:
Induction of cytotoxic T lymphocytes against Herpes
simplex virus type 1: Role of accessory cells and ampli-
fying factor.
J. Immunol. 124: 2341 (1980)
205. Rouse, B.T., Larsen, H.S. and H. Wagner:
Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors to Herpes
simplex virus type 1 as determined by limiting dilution
analysis.
Infect. Immun. 39: 785 (1983)
206. Rühl, H., Vogt, W., Bochart, G. and T. Diamantstein:
Stimulation of B cells by poly A : poly U and poly I : poly C
in vitro.
Immunology 26: 937 (1974)
207. Saito, M., Aoyagi, T., Umezawa, H. and Y. Nagai:
Bestatin, a new specific inhibitor of aminopeptidases,
enhances activation of small lymphocytes by concanavalin A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 526 (1977)
208. Schlabach, A.J., Martinez, D., Field, A.K. and A.A. Tytell:
Resistance of C58 mice to primary systemic Herpes simplex
virus infection: Macrophage dependence and T-cell in-
dependence.
Infect. Immun. 26: 615 (1979)
209. Schmid, D.S., Larsen, H.S. and B.T. Rouse:
The role of accessory cells and T cell-growth factor in
induction of cytotoxic T lymphocytes against Herpes
simplex virus antigens.
Immunology 44: 755 (1981)
210. Schmid, D.S., H.S. Larsen and B.T. Rouse:
Role of Ia antigen expression and secretory function of
accessory cells in the induction of cytotoxic T lympho-
cyte responses against Herpes simplex virus.
Infect. Immun. 37: 1138 (1982)

211. Schmidt, N.J., Forghani, B. and E.H. Lennette:
Type specificity of complement-requiring and immuno-
globulin M neutralizing antibody in initial Herpes
simplex virus infections of humans.
Infect. Immun. 12: 728 (1975)
212. Schneweis, K.E.:
Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des
Herpesvirus hominis.
Z. Immun. Forsch. 124: 24 (1962)
213. Schneweis, K.E.:
Die Typen 1 und 2 des Herpes-simplex-Virus bei verschie-
denen Krankheitsbildern.
Dtsch. med. Wschr. 92: 2213 (1967)
214. Schneweis, K.E., Gruber, J., Hilfenhaus, J., Möslin, A.,
Kayser, M. and M.H. Wolff:
The influence of different modes of immunization on the
experimental genital Herpes simplex virus infection of
mice.
Med. Microbiol. Immunol. 169: 269 (1981)
215. Schorlemmer, H.U., Bosslet, K. and H.H. Sedlacek:
Tumoricidal activity of mononuclear phagocytes induced
by the immunomodulating dipeptide bestatin.
XIV. Tagung der Gesellsch. f. Immunologie, Münster.
Immunobiology 162: 419 (1982)
216. Schrier, R.D., Pizer, L.I. and J.W. Moorhead:
Tolerance and suppression of immunity to Herpes simplex
virus: Different presentations of antigens induce different
types of suppressor cells.
Infect. Immun. 40: 514 (1983)
217. Schröder, C.H., Engler, H. and H. Kirchner:
Protection of mice by an apathogenic strain of HSV-1
against lethal infection by a pathogenic strain of HSV-1.
J. Gen. Virol. 52: 159 (1981)
218. Sekizawa, T., Openshaw, H., Wohlenberg, C. and A.L.
Notkins:
Latency of Herpes simplex virus in absence of neutralizing
antibody: Model for reactivation.
Science 210: 1026 (1980)
219. Sethi, K.K. and H. Brandis:
In vitro acquisition of resistance against Herpes simplex
virus by permissive murine macrophages.
Arch. Virol. 59: 157 (1979)
220. Sethi, K.K.:
Effects of monoclonal antibodies directed against Herpes
simplex virus-specified glycoproteins on the generation of
virus-specific and H-2-restricted cytotoxic T-lymphocytes.
J. Gen. Virol. 64: 2033 (1983)

221. Shimizu, F., Satoh, J., Tada, M. and K. Kumagai:
Suppression of in vitro growth of virulent and avirulent
Herpes simplex viruses by cell-mediated immune mechanisms,
antibody and interferon.
Infect. Immun. 22: 752 (1978)
222. Shore, S.L., Black, C.M., Melewicz, F.M., Wood, P.A.
and A.J. Nahmias:
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to target
cells infected with type 1 and type 2 Herpes simplex
virus.
J. Immunol. 116: 194 (1976)
223. Shore, S.L., Cromeans, T.L. and T.J. Romano:
Immune destruction of virus-infected cells early in the
infectious cycle.
Nature 262: 695 (1976)
224. Shore, S.L., Melewicz, M. and D.S. Gordon:
The mononuclear cell in human blood which mediates anti-
body-dependent cellular cytotoxicity to virus-infected
target cells.
J. Immunol. 118: 558 (1977)
225. Shore, S.L., Cromeans, T.L. and B. Norrild:
Early damage of Herpes-infected cells by antibody-depend-
ent cellular cytotoxicity: Relative roles of virus-
specified cell-surface antigens and input virus.
J. Immunol. 123: 2239 (1979)
226. Shore, S.L. and T.J. Romano:
Analysis of the lytic step in the Herpes simplex virus
antibody-dependent cellular cytotoxicity system.
Infect. Immun. 28: 137 (1980)
227. Snyder, D.S., Beller, D.I. and E.R. Unanue:
Prostaglandins modulate macrophage Ia expression.
Nature 299: 163 (1982)
228. Solammadevi, S.V. and R. Patwardhan:
Herpes esophagitis.
Am. J. Gastroenterol. 77: 48 (1982)
229. Spear, P.G. and B. Roizman:
Herpes simplex viruses.
In: Molecular Biology of Tumor Viruses.
Part 2: DNA Tumor Viruses. S. 615; J. Tooze (ed.)
Cold Spring Harbor, England, 1980
230. Spector, W.G.:
Macrophage turnover and traffic: A review.
In: The Proceedings of the EURES Symposium on the Macro-
phage and Cancer. U. James, B. McBride and A. Stuart (eds.)
Edinburgh, Schottland, 1977

231. Stebbing, N., Lindley, J.D. and K.M. Dawson:
Variations in the contribution of induced interferon and adjuvanticity to the antiviral effect of different polyinosinic acid-polycytidylic acid formulations in mice infected with encephalomyocarditis virus.
Infect. Immun. 29: 960 (1980)
232. Stevens, J.G. and M.L. Cook:
Restriction of Herpes simplex virus by macrophages. An analysis of the cell-virus interaction.
J. Exp. Med. 133: 19 (1971)
233. Stevens, J.G. and M.L. Cook:
Maintenance of latent herpetic infection: An apparent role for anti-viral IgG.
J. Immunol. 113: 1685 (1974)
234. Subak-Sharpe, J.H. and M.C. Timbury:
Genetics of Herpesviruses.
In: Comprehensive Virology. Vol. 9: Regulation and Genetics - Genetics of Animal Viruses. S. 89;
H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner (eds.)
Plenum Press, New York, 1977
235. Tarcic, N. and D. Naor:
Delayed-type hypersensitivity induced in immunodeficient mice with syngeneic modified self antigens: A suggestive model of autoimmune response.
Eur. J. Immunol. 12: 961 (1982)
236. Tokumaru, T.:
A possible role of γ A-immunoglobulin in Herpes simplex virus infection in man.
J. Immunol. 97: 248 (1966)
237. Townsend, J.J.:
Trigeminal nerve lesions after corneal HSV infection: Cellular responses.
In: Herpetische Augenerkrankungen. S. 33;
R. Sundmacher (ed.)
J.F. Bergmann Verlag, München, 1981
238. Toy, J.L.:
The interferons.
Clin. Exp. Immunol. 54: 1 (1983)
239. Trang, L.E.:
Prostaglandins and inflammation.
Seminars in Arthritis and Rheumatism IX: 153 (1980)
240. Trofatter, K.F.jr. and C.A. Daniels:
Effect of prostaglandins and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate modulators on Herpes simplex virus growth and interferon response in human cells.
Infect. Immun. 27: 158 (1980)

241. Underwood, G.E. and S.D. Weed:
Recurrent cutaneous Herpes simplex in hairless mice.
Infect. Immun. 10: 471 (1974)
242. Wagner, H. and M. Rölinghoff:
T cell-mediated cytotoxicity to virus-infected cells.
Behring Inst. Mitt. 61: 31 (1977)
243. Wagner, H., Hardt, C., Stockinger, H., Pfizenmaier, K.,
Bartlett, R. and M. Rölinghoff:
Impact of thymus on the generation of immunocompetence
and diversity of antigen-specific MHC-restricted cyto-
toxic T-lymphocyte precursors.
Immunol. Rev. 58: 95 (1981)
244. Wallis, C. and J.L. Melnick:
Herpesvirus neutralization: The role of complement.
J. Immunol. 107: 1235 (1971)
245. Welsh, R.M.jr.:
Mouse natural killer cells: Induction specificity and
function.
J. Immunol. 121: 1631 (1978)
246. Welsh, R.M.jr. and L.A. Hallenbeck:
Effect of virus infections on target cell susceptibility
to natural killer cell-mediated lysis.
J. Immunol. 124: 2491 (1980)
247. Wiechert, R., Steinbeck, H., Elger, W. und F. Neumann:
Wirkungen und Struktur neuer antiandrogener Steroide.
Arzneimittelforsch. (Drug Res.) 17: 1103 (1967)
248. Wildy, P., Field, H.J. and A.A. Nash:
Classical Herpes latency revisited.
In: Virus Persistence. S. 131;
B.W.J. Mahy, A.C. Minson and G.K. Darby (eds.)
33. Symposium of the Society for General Microbiology.
Cambridge University Press, 1982
249. Woodruff, J.F. and J.J. Woodruff:
The effect of viral infections on the function of the
immune system.
In: Viral Immunology and Immunopathology. S. 393;
A.L. Notkins (ed.)
Academic Press, New York, 1975
250. Worthington, M., Conliffe, M.A. and S. Baron:
Mechanism of recovery from systemic Herpes simplex virus
infection. I. Comparative effectiveness of antibody
and reconstitution of immune spleen cells on immuno-
suppressed mice.
J. Inf. Dis. 142: 163 (1980)

251. Worthington, M., Conliffe, M.A. and S. Baron:
Mechanism of recovery from systemic Herpes simplex virus infection. II. Effectiveness of antibody reconstitution of nude and neonatally thymectomized mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 165: 462 (1980)
252. Yeager, A.S., Arvin, A.M., Urbani, L.J. and J.A. Kemp III.:
Relationship of antibody to outcome in neonatal Herpes simplex virus infections.
Infect. Immun. 29: 532 (1980)
253. Yoshino, K. and S. Taniguchi:
Evaluation of the demonstration of complement-requiring neutralizing antibody as a means for early diagnosis of Herpes virus infections.
J. Immunol. 96: 196 (1966)
254. Yoshino, K. and N. Isono:
Studies on the neutralization of Herpes simplex virus. IX. Variance in complement requirement among IgG and IgM from early and late sera under different sensitization conditions.
Microbiol. Immunol. 22: 403 (1978)
255. Zawatzky, R., Hilfenhaus, J. and H. Kirchner:
Resistance of nude mice to Herpes simplex virus and correlation with in vitro production of interferon.
Cell. Immunol. 47: 424 (1979)
256. Zawatzky, R., Hilfenhaus, J., Marcucci, F. and H. Kirchner:
Experimental infection of inbred mice with Herpes simplex virus type 1. I. Investigation of humoral and cellular immunity and of interferon induction.
J. Gen. Virol. 53: 31 (1981)
257. Zawatzky, R., Gresser, I., DeMaeyer, V.E. and H. Kirchner:
The role of interferon in the resistance of C57BL/6 mice to various doses of Herpes simplex virus type 1.
J. Inf. Dis. 146: 405 (1982)
258. Zisman, B., Hirsch, M.S. and A.C. Allison:
Selective effects of anti-macrophage serum, silica and anti-lymphocyte serum on pathogenesis of Herpes virus infection of young adult mice.
J. Immunol. 104: 1155 (1970)
259. Zweerink, H.J. and L.W. Stanton:
Immune response to Herpes simplex virus infections: Virus-specific antibodies in sera from patients with recurrent facial infections.
Infect. Immun. 31: 624 (1981)

Lebenslauf

Name: Andreas Knoblich
Geburtstag: 4. Oktober 1957
Geburtsort: Trier
Eltern: Gerhard Knoblich (Dr.rer.nat., Entwicklungsingenieur);
Ursula Knoblich, geb. Semmelroth
(Hausfrau)

Schulausbildung:

April 1964 Einschulung in die Friedrich-Ludwig-Jahn-Schule (Grundschule) in Wiesbaden
September 1967 Aufnahme in die Oranienschule Wiesbaden (Städt. Realgymnasium)
18. Mai 1976 Ablegung der Reifeprüfung

Studium

WS 1976/77 Immatrikulation an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz im Fach Humanmedizin
August 1978 Ärztliche Vorprüfung
August 1979 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1982 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1982 bis März 1983 Praktisches Jahr am Mutterhaus der Borromäerinnen in Trier
Mai 1983 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
7. Juni 1983 Approbation als Arzt

Oktober 1979 Doktorand im Institut für Medizinische
bis Juli 1984 Mikrobiologie der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. P. Klein),
Abteilung für Experimentelle Virologie
(Leiter: Prof. Dr. D. Falke)

